

**Neutrale Proteasen
aus menschlichen Leukozyten:
Isolierung, Charakterisierung
und biologische Wirkungen**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**von
Wilhelm Schmidt
aus Muttischen**

Marburg 1975

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

**Neutrale Proteasen
aus menschlichen Leukozyten:
Isolierung, Charakterisierung
und biologische Wirkungen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

**Wilhelm Schmidt
aus Muttischen**

Marburg 1975



Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als Dissertation angenommen am **21.04.1975**

Tag der mündlichen Prüfung: **30.04.1975**

Dekan:	Prof. Dr. C. Reichardt
Berichterstatter:	Prof. Dr. F. Schneider
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. B. Kadenbach

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Prof.Dr.K.Havemann

in Zusammenarbeit mit

Herrn Prof.Dr.F.Schneider

im Physiologisch-chemischen Institut II und der Medizinischen Universitätsklinik (Direktor: Prof.Dr.G.A.Martini) der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Für die großzügige Förderung und viele anregende Diskussionen danke ich Herrn Prof.Dr.K.Havemann, Herrn Prof.Dr.F.Schneider und Herrn Prof.Dr.R.Egbring.

Für vorzügliche technische Assistenz danke ich Fräulein B. Anton, Fräulein E. Walter und Fräulein B. Ertl.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 <u>Einleitung</u>	1
Fragestellung	8
2 <u>Material und Methoden</u>	
2.1 Geräte	9
2.2 Chemikalien	10
2.3 Zellmaterial	14
2.3.1 Isolierung polymorphkerniger und mononukleärer Leukozyten	14
2.3.2 Isolierung von Lymphozyten und Monozyten	15
2.3.3 Isolierung von B- und T-Lymphozyten	16
2.4 Analytische Methoden	17
Polyacrylamidgelelektrophoresen	21
Immunologische Verfahren	24
2.5 Enzympräparation	26
2.6 Freisetzung der Proteasen aus Granulozyten in vitro	27
2.7 Einwirkung der Proteasen auf Lymphozyten	28
2.7.1 Lymphozytenkultur	28
2.7.2 Wirkung auf Rezeptoren von T-Lymphozyten	30
2.7.3 Wirkung auf Rezeptoren von B-Lymphozyten	31
2.7.4 Mitogenbindung von Lymphozyten	33
2.8 Proteolyse von Faktoren des Blutgerinnungssystems	34
3 <u>Ergebnisse</u>	
3.1 Vorkommen neutraler Proteasen	36
3.2 Reinigung der Proteasen	37
Ausbeuten und Reinheit	40
Alternative Reinigungsverfahren	44
3.3 Eigenschaften der Leukozytenproteasen	46
3.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften	46
3.3.2 Stabilität	50
3.3.3 Enzymatische Aktivität	51
Proteinsubstrate	51
Estersubstrate	55

	Seite
3.3.4	Inhibitoren 62
3.3.5	Immunologische Charakterisierung 67
3.4	In vitro-Freisetzung der Proteasen aus Granulozyten 68
3.5	Einfluß der Proteasen auf das Blutgerinnungssystem 69
3.6	Einwirkung der Proteasen auf Lymphozyten 71
3.6.1.1	Stimulierung von T-Lymphozyten 71
3.6.1.2	Stimulierung von B-Lymphozyten 78
3.6.2	Beeinflußung der Mitogenbindung von Lymphozyten 81
3.6.3.1	Rezeptoren von T-Lymphozyten 82
3.6.3.2	Rezeptoren von B-Lymphozyten 84
4	<u>Diskussion</u>
4.1	Vorkommen und Reinigung 87
4.2	Eigenschaften der neutralen Proteasen 88
4.3	Abgrenzung gegen andere Proteasen 91
4.4	Biologische Bedeutung der neutralen Proteasen 93
4.4.1	Freisetzung der Proteasen in vitro 94
4.4.2	Wirkung auf Plasmaproteine 95
4.4.3	Wirkung auf Lymphozyten 98
4.5	Bedeutung der Granulozyten in vivo 107
5	<u>Zusammenfassung</u> 109
6	<u>Literaturverzeichnis</u> 112

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A Ala ₃ CK	Acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanylchloromethylketon
Ac-Ala-ONaph	Acetyl-L-alanyl- -naphthylester
Ac-Phe-ONaph	Acetyl-D,L-Phenylalanyl- -naphthylester
AgAK	Antigen-Antikörper-Komplex
α_1 AC	α_1 Antichymotrypsin
α_1 AT	α_1 Antitrypsin
α_2 M	α_2 Makroglobulin
BOC	t-Butyloxycarbonyl
BOC-Ala-ONp	BOC-L-Alanyl-p-Nitrophenylester
BOC-Phe-ONp	BOC-L-Phenylalanyl-p-Nitrophenylester
C ₃	3. Komplementkomponente
C ₁ EI	C ₁ Esteraseinhibitor
CLP	Chymotrypsinähnliche Leukozytenprotease
Cys	L-Cystein
DFP	Diisopropylphosphorofluoridat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EA	Amborezeptorbeladene Schafserythrozyten
EAC	Erythrozyten-Ambozeptor-Komplement-Komplex
ELP	Elastaseähnliche Leukozytenprotease
F	Fluoreszein
F-Hb-denat.	Fluoreszeinmarkiertes, denaturiertes Hämoglobin
JAA	Jodacetamid
KI	Kallikreintrypsininhibitor
LBI	Limabohneninhibitor
LDH	Lactatdehydrogenase (E.C. 1.1.1.27)
Lps	Lipopolysaccharid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pCMB	p-Chlormercuribenzoat
PHA	Phythämagglutinin
PI	Pankreastrypsininhibitor
PMN	Polymorphkernige Leukozyten

PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
poly IC	Polyinosyl-polycytidylsäure
P + S	Penicillin und Streptomycin
SBJ	Sojabohnentrypsininhibitor
TLCK	Tosyl-L-Lysylchloromethylketon
TPCK	Tosyl-L-Phenylalanylchloromethylketon
Z -	Benzyloxycarbonyl-

EINLEITUNG

Die phagozytierenden Zellen der Säugetiere lassen sich in vier Haupttypen einteilen (1):

1. Gewebsmakrophagen, die sich wahrscheinlich von zirkulierenden Monozyten herleiten
2. Kupffer'sche Zellen
3. Retikulumzellen der Lymphknoten und der Milz
4. Zirkulierende polymorphkernige Leukozyten (PMN)

Die ersten drei Zelltypen sind sehr stabile Populationen mit Lebenszeiten von Wochen bis Monaten. Sie haben eine Überwachungsfunktion für die Instandhaltung des Körpers, indem sie noxische Substanzen entfernen sowie Zellen und Zellbruchstücke aus den Körperflüssigkeiten und Geweben aufnehmen. Weiterhin unterstützen sie das körpereigene Immunsystem. Auf der anderen Seite stehen die polymorphkernigen Leukozyten mit einer sehr viel kürzeren Lebensdauer von nur einigen Tagen. Diese Phagozyten sind besonders dazu bestimmt, den Körper vor eindringenden Mikroorganismen zu schützen, aber sie können auch endogenes Material phagozytieren, wie Fibrin oder Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach erfolgter Phagozytose und Degranulierung sind die Granulozyten unfähig Granula zu resynthetisieren oder die Energieproduktion aufrechtzuerhalten und sterben sehr rasch.

Die gegenwärtigen Befunde weisen daraufhin, daß Granulozyten und Monozyten aus der gleichen, bereits vorgeprägten Stammzelle entstehen (2). In Analogie zum Erythropoetin wird angenommen, daß Poetine der reifen Endstufen in einer feedback-Kontrolle die Differenzierung steuern. Zwischen Granulozyten und Monozyten bestehen jedoch wesentliche kinetische Unterschiede: Granulozyten werden im Knochenmark zurückgehalten bis ihre Differenzierung und Reifung abgeschlossen ist, während Monozyten als unreife Zellen in die Zirkulation abgegeben werden und sich nach Verlassen des Blutkreislaufes wieder teilen können. Die-

se aus der Zirkulation auswandernden Monozyten scheinen die Vorläuferzellen für makrophagozytäre Komponenten des weitverzweigten retikuloendothelialen Systems zu sein. Granulozyten entstehen aus Vorstufen im Knochenmark während einer 3-4tägigen Periode der Zellproliferation, an die sich eine 5-7-tägige Phase der Zellreifung anschließt. Hierdurch wird das Knochenmark zum Hauptgranulozytenspeicher des Körpers, aus dem je nach Bedarf schnell Granulozyten in die Peripherie abgegeben werden können. Die Halbwertszeit der PMN im Blut, das nur Transportfunktion erfüllt, beträgt nur 6-7 Stunden. In Erfüllung ihrer Funktion migrieren die PMN durch das vasculäre Endothel in die Gewebe und Körperhöhlen, wo sie unterschiedliche Zeiträume überleben (3).

Der das Knochenmark verlassende Granulozyt ist eine voll funktionsfähige Zelle, die in der Lage ist, durch chemotaktische Reize gezielt an den Ort der Reaktion zu wandern, um dort ihre komplexen Funktionen der Phagozytose, Endozytose, lysosomalen Degranulierung und Abtötung von Krankheitserregern zu erfüllen. Die zahlenmäßig bei weitem am häufigsten vorkommenden neutrophilen Granulozyten entwickeln auf der Stufe des Promyelozyten sogenannte azurophile oder primäre Granula aus dem proximalen Golgi-Komplex, die saure Phosphatasen, saure Hydrolasen, Myeloperoxidase, saure Mukopolysaccharide und andere Komponenten enthalten. Mit der Reifung des Myelozyten werden keine weiteren azurophilen Granula gebildet, während gleichzeitig sich aus dem distalen Golgi-Apparat ein besonderer Typ sekretorischer Granula, die sekundären oder spezifischen Granula bilden, die alkalische Phosphatase, Laktoferrin und den größten Anteil des Lysozyms der PMN enthalten. Der reife PMN enthält etwa 80-90 % spezifische Granula sowie 10-20 % der größeren azurophilen Granula (4). Bereits auf der Stufe des Myelozyten verliert der Granulozyt die meisten seiner Mitochondrien und beginnt den für reife PMN charakteristischen Sauerstoff-Stoffwechsel zu entwickeln. Gleichzeitig wird der PMN eine phagozytierende

Zelle, womit die morphologischen Voraussetzungen für seine endgültige Rolle als Bakterien-zerstörende Zelle gegeben sind.

Die mit diesen Vorgängen zusammenhängenden Funktionen der Chemotaxis, der Phagozytose, der Endozytose, der Phagosomenbildung mit lysosomaler Degranulation, der Abtötung und schließlich der Verdauung der Krankheitserreger werden intensiv untersucht (Übersichten: 1, 2).

Viele Substanzen, angefangen von bakteriellen Produkten bis zu definierten Komponenten des Komplementsystems besitzen chemotaktische Aktivität für PMN. Zu den letzteren zählen niedermolekulare proteolytische Spaltprodukte der 3. und 5. Komplement-Komponente sowie hochmolekulare Komplexe aus C5, C6 und C7 (5). Auch eine Hagemann-Faktor-Aktivierung führt zur Bildung von chemotaktischen Produkten (6, 7). Es wird angenommen, daß die chemotaktischen Faktoren auf die Plasmamembran wirken und dabei eine gerichtete Bewegung des Neutrophilen veranlassen ohne seine Bewegung zu beschleunigen. Die zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen der gerichteten Chemotaxis sind noch unbekannt. Von gleicher Bedeutung sind Substanzen, die entweder den Neutrophilen immobilisieren, ihn refraktär gegenüber chemotaktischer Aktivierung machen oder chemotaktische Agentien neutralisieren (8, 9), ohne dabei die Phagozytosefähigkeit und den Stoffwechsel der PMN zu beeinflussen. Diesen Faktoren, die zum Teil in den Granulozyten selbst gebildet werden, kommt vermutlich eine wichtige Bedeutung bei der Hemmung der Migration nach ihrer Ansammlung am Ort der Entzündung zu. Nach der Akkumulation von PMN im Gebiet der bakteriellen Invasion wird der nächste Prozeß, die Phagozytose und Verdauung der Erreger ausgelöst. Dieser Mechanismus wird durch bestimmte humorale Faktoren, die sogenannten Opsonine beeinflusst. Hierzu gehören Antikörper der IgG-Klasse, die sich spezifisch oder unspezifisch an die Mikrobenmembran binden, sowie

hitzelabile Opsonine des Komplement- und Properdin-systems, die über ihre Bindung an die Krankheitserreger die Phagozytose veranlassen (10). Durch die Opsonisierung wird die Phagozytose von einer praktisch zu vernachlässigenden Spontanphagozytose auf das Vielfache potenziert, wobei der Granulozyt offenbar die gebundenen Opsonine über Immunglobulin- und Komplement-Rezeptoren erkennt. Nach erfolgter Phagozytose und Aufnahme des Erregers in eine phagozytische Vakuole durchlaufen die Granulozyten eine Reihe von anatomischen - und Stoffwechseleränderungen, die zur Folge haben, daß die phagozytierenden Erreger abgetötet werden. So kommt es bereits nach Sekunden zu einem Kontakt der Cytoplasma-Granula mit der phagozytischen Vakuole, wobei die sekundären Granula, gefolgt von den primären Granula ihren Inhalt in die Vakuole entleeren (11). Die antimicrobiellen- und Verdauungsenzyme bewirken dann die Abtötung des Erregers. Parallel dazu kommt es zu einer bis zu 20-fachen Steigerung des Sauerstoffsverbrauchs dem eine vermehrte Wasserstoffperoxyd-Produktion und Glukose-Oxydation über den Glukose-Monophosphatshunt parallel geht (12). Für die bakteriziden Eigenschaften des PMN kommt besonders dieser Wasserstoffperoxydproduktion zusammen mit der Myeloperoxydase besondere Bedeutung zu (2). Daneben scheinen jedoch noch eine Reihe von stark kationischen Granulaproteinen eine deutliche bakterizide Eigenschaft zu besitzen (13, 14), die zum Teil als niedermolekulare Proteine charakterisiert sind (15), zum Teil aber höhermolekularer sind und Esteraseaktivität besitzen (2). Die an der nun folgenden Verdauung der Erreger beteiligten proteolytischen Enzyme sind fast ausschließlich als Proteasen mit einem Wirkungsoptimum bei unphysiologischem pH beschrieben und charakterisiert worden. In der Tat scheint der bei dem Degranulierungsprozeß in der Verdauungsvakuole abfallende pH (häufig unter pH 4,5 wie bei Ratten-PMN untersucht) ihre Wirkung zu ermöglichen (16).

Im Gegensatz zu der gut untersuchten Funktion des PMN als Phagozyt und als Zelle mit der Fähigkeit zur intrazellulären Abtötung von Krankheitserregern sind die bisherigen Ergebnisse über die Eigenschaften des Granulozyten als sekretorische Zelle äußerst lückenhaft. Dies gilt sowohl für die Abgabe intrazellulärer Substanzen und ihre Wirkung auf Komplement-Gerinnungs- und Kininsystem wie auch für die zelluläre Kooperation zwischen Granulozyten und anderen an Abwehrreaktionen beteiligten Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten. Es konnte gezeigt werden, daß PMN in Gegenwart von Antigen-Antikörperkomplexen, von Endotoxin und bei Anlagerung an nicht phagozytierbare Oberflächen lysosomale Enzyme durch Exozytose freisetzen (17). Auch die Abgabe lysosomaler PMN-Enzyme während der Endozytose, durch cyclisches AMP oder durch Faktoren, die den Spiegel an intrazellulärem cyclischem AMP anheben, wie Theophyllin oder Prostaglandin, konnte gezeigt werden (18). Diese Freisetzung führt zu einer Zerstörung des umgebenden Gewebes (19). Dadurch erhalten Neutrophile eine Schlüsselfunktion bei Entzündungsprozessen, bei Arthritis und bei Immunkomplexkrankheiten.

In jüngster Zeit zeigen sich Hinweise, daß Granulozyten auch an zellulären Immunreaktionen beteiligt sind. Die proliferative Reaktion der Lymphozyten auf Antigen wird als typischer Ausdruck zellulärer Immunität in vitro angesehen. Außer von der Gegenwart des Antigens ist die Lymphozytenproliferation abhängig von verschiedenen unspezifischen Faktoren (20), von denen der Einfluß adherenter Zellen (Granulozyten und Monozyten) während der Frühphase der Antigenerkennung der wichtigste zu sein scheint. Es wurde gezeigt, daß die adherenten Zellen, die für die Reaktion gereinigter Lymphozyten auf Antigen, unspezifisches Mitogen oder allogene Zellen notwendig sind, durch Kulturüberstände dieser Zellen ersetzt werden können (21, 22, 23). Zumindest ein Teil der Wirkung dieser Zellüberstände ist auf proteolytische Enzyme zurückzuführen, die hauptsächlich aus Granulozyten stammen (24).

Sowohl für die Bindegewebsschädigung durch in den Extrazellulärraum abgegebenen Granulozytenenzyme wie für die Beeinflussung des Gerinnungs- und Kininsystems und die Adjuvanswirkung bei zellulären Immunreaktionen sind weniger die sauren Hydrolasen und Kathepsine als vielmehr die neutralen Proteasen von besonderem Interesse, die bei physiologischen pH-Werten ihr Wirkungsoptimum haben.

Proteasen, die bei neutralem oder schwach alkalischem pH Fibrin abbauen, wurden schon von RULOT (25) und OPIE (26) in PMN nachgewiesen. WILLSTÄTTER konnte die caseinolytische Aktivität der Leukozyten bei neutralem pH ebenfalls den Granulozyten zuordnen (27). Diese Befunde wurden in späteren Untersuchungen bestätigt und erweitert (28-33). Neuere Befunde von OHLSSON haben gezeigt, daß menschliche PMN zwei neutrale Proteasen enthalten, die Fibrinogen abbauen (34). Elastin und Hämoglobin abbauende neutrale Proteasen wurden von JANOFF und SCHERER in menschlichen Granulozyten gefunden (35) und in den primären Granula der Lysosomen lokalisiert (30). Es wurde gezeigt, daß diese leukozytäre Elastase an der Bindegewebszerstörung bei bestimmten vasculären und Bindegewebserkrankungen beteiligt ist (19). Eine von der Elastase durch fehlende Serumhemmung unterscheidbare granulozytäre Kollagenase soll für den Kollagenabbau bei chronischen Entzündungen verantwortlich sein (37). Es wurde weiterhin gezeigt, daß neutrale Proteasen aus menschlichen Granulozyten Chondromucoprotein abbauen (38) sowie auf das Komplementsystem einwirken (39) und Kinin generieren können (40). Außer beim Menschen wurden neutrale Proteasen auch im Kaninchen, der Ratte und beim Pferd nachgewiesen. In den neutrophilen Granulozyten von Kaninchen haben BECKER und WARD ferner eine Ac-Phe-ONaph-Esterase beschrieben, die an der chemotaktischen Reaktion dieser Zellen beteiligt sein soll (41, 42).

Keines der beschriebenen Enzyme war zu Beginn dieser Arbeit ausreichend gereinigt, um ihre chemische Charakteri-

sierung zu erlauben und um gezielte Versuche durchzuführen.

Zusätzlich zum Abbau der zwischenzellulären Substanzen des Bindegewebes können PMN-Proteasen auch die Oberflächeneigenschaften lebender Zellen des entzündeten Gewebes verändern. Dies könnte von Bedeutung sein für den Prozeß der Carcinogenese, denn es wurde gezeigt, daß die Einwirkung von Trypsin und Papain in nicht letalen Konzentrationen auf kultivierte Mausfibroblasten zu einer vorübergehenden Änderung der Wachstumseigenschaft der betreffenden Zellen führt, der Veränderungen des cyclischen AMP-Spiegels, der Agglutinierbarkeit mit Pflanzenlektinen und die Freisetzung von normalerweise markierten chemischen Gruppierungen an der Zelloberfläche parallel gehen (43, 44). Die Änderungen des Zellwachstumsverhaltens, die unter diesen Bedingungen erfolgen, ähneln in auffälliger Weise dem Verlust der Kontakthemmung, der bei virustransformierten Fibroblasten beobachtet wird. Die durch kurze Behandlung mit proteolytischem Enzym verursachte Wachstumsstimulierung ist jedoch vorübergehend und die normale Wachstumskontrolle stellt sich wieder ein, sobald die Zelle ihre ursprüngliche Oberflächenstruktur wiederhergestellt hat. Durch chronische oder wiederkehrende Reizungen des Gewebes durch Proteasen, die aus Leukozyten freigesetzt werden, könnte sehr wohl ein langdauernder Effekt auf das Zellwachstum des gereizten Gewebes ausgeübt werden (45). Andererseits können die am Ort des Immungeschehens vorhandenen Lymphozyten, deren physiologische Aufgabe es ist, auf antigenen Reiz hin ihr spezifisches Abwehrsystem auszubilden, durch freigesetzte Granulozyten-Proteasen in ihrer Transformation beeinflusst werden.

PMN-Proteasen waren bisher nicht auf ihre Fähigkeit zur Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von kultivierten Fibroblasten oder Lymphozyten untersucht worden. In diesem Zusammenhang ist es jedoch bemerkenswert, daß 1. phagozy-

tierende Leukozyten für die durch Antigen oder Mitogen induzierte Transformation gereinigter Lymphozyten notwendig sind (46), daß 2. Protease-Inhibitoren die tumorfördernden Eigenschaften von Kokarzinogenen (47), die Agglutininierbarkeit und die Mitoserate transformierter Zellen (48-50) sowie die mitogenabhängige Lymphozytentransformation hemmen (51, 52) und, daß 3. wie kürzlich gefunden wurde, in Kulturüberständen transformierter Zellen proteolytische Aktivität nachweisbar ist, die zusammen mit einem Serumfaktor die DNS-Synthese ruhender Zellen stimuliert (48).

FRAGESTELLUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte

- a) zunächst festgestellt werden, welche der in menschlichem peripherem Blut vorhandenen Leukozyten Subpopulationen neutrale Proteasen enthalten und in welchen Zellkompartimenten sie lokalisiert sind.
- b) Sodann sollte das oder die Enzyme isoliert und hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen und enzymatischen Eigenschaften charakterisiert werden.
- c) Um die Frage der biologischen Bedeutung der Proteasen über die bekannte Funktion der Phagozytose mikrobieller Antigene hinaus zu klären, war zunächst festzustellen, ob und unter welchen Bedingungen die Enzyme von Leukozyten abgegeben werden.
- d) Der Einfluß der Enzyme auf das Blutgerinnungssystem sollte untersucht werden.
- e) Die Wirkung der Enzyme auf die Lymphozytenzellmembran sowie der Einfluß auf die Stimulierung der DNS-Synthese von Lymphozyten sind zu untersuchen.

Auf Grund der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse wird die bisher weitgehend unklare Funktion der neutrophilen Granulozyten für das zelluläre Immungeschehen zu diskutieren sein.

2 MATERIAL UND METHODEN

2. 1 GERÄTE

Zentrifugen

Kühlzentrifuge Typ UI U KS	Christ, Osterode
MSE High speed 25	MSE Ltd., London, England

Mikroskop

SM-Lux mit Orthoplan	Leitz, Wetzlar
----------------------	----------------

Photometer

Spektralphotometer M4 QIII	Zeiss, Oberkochen
Verstärker PM QII	
Eppendorf-Photometer 1101M	Eppendorf-Gerätebau, Kelster-
Kompensationsschreiber 4410	bach
Fluorimeter-Aufsatz	
Thermostat	Haake, Berlin
pH-Meter, Wasserbäder	Vogel, Gießen

Chromatographie-Ausrüstung

Glassäulen	LKB, Bromma, Schweden
Durchflußphotometer Uricord	
II	
6 Kanalpunktschreiber	
Fraktionssammler Ultrovac	
Perpexpumpen	
Gradientenmischer	
Ultrafiltrationseinheit 52	Amicon, Oosterhout, Holland
und 202	

Elektrophoresegeräte

Polyacrylamidgelelektropho-	Colora, Lorch
resegerät Ultraphor	
Gleichstromgerät UP 4	
Kühlbox	
Immunelektrophoreseapparatur	LKB, Bromma, Schweden
2-D-Elektrophorese	Behringwerke, Marburg
Densitometer: TLD 100	Vitatron, Dieren, Holland

Ausrüstung für Zellkulturen

"Fenwal"-Blutbeutel JH-1	Travenol Lab., Brüssel, Belgien
Nylonwatte aus LP-1 Leuko-	
PakR	
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Millipore GmbH, Neu-Isenburg
Linbro FB-24 Gewebekultur-	LS-Labor-Service, München
platten	

Brutschrank, begasbar	Heraeus, Hanau
Zellkultur-Vielfachfiltrationsgerät	Skatron, Lierbyen, Norwegen
Glasgeräte wurden mit "7x" gewaschen, mit Chromschwefelsäure entfettet, mit 2 % Silikonöl WS 60 in Tetrachlor-Kohlenstoff behandelt und 2 Stunden bei 200°C sterilisiert	Serva, Heidelberg Wacker-Chemie, München

Radioaktivitätsmessung

"Tri-Carb" Flüssigkeitsszintillationszähler Mod.574	Packard Instr. Co. Downers Grove, Ill. U.S.A.
---	---

2. 2 CHEMIKALIEN

2. 2. 1 Proteasesubstrate

Hämoglobin (Rind)	Merck, Darmstadt
Elastin (Rind)	
Albumin (Rinderserum)	
Casein, Hammersten	NBC, Cleveland, U.S.A.
Fibrinogen (Rind, F XIII-u. Plasminogenfrei)	Behringwerke, Marburg
Blutgerinnungsfaktoren II, V, VII, VIII, XIII (human, gereinigt, Laborpräparate)	" "
Hagemann-Faktor (F XII, human, gereinigt)	Dr. Temme, Gießen

2. 2. 2 Esterasesubstrate

BOC-L-Alanin-4-Nitrophenylester	Fluka, Buchs, Schweiz
BOC-L-Phenylalanin-4-Nitrophenylester	
Acetyl-D,L-Phenylalanin- - Naphthylester	Sigma Chem. Comp., St.Louis, U.S.A.
Acetyl-L-Alanin- α -Naphthylester	Acetylierung von L-Alanin mit Acetanhydrid (53) und Veresterung mit α -Naphthol mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (54).
Alle anderen Esterasesubstrate	Serva, Heidelberg

2. 2. 3 Proteaseinhibitoren

α_1 -Antitrypsin (Laborpräparat)	Behringwerke, Marburg
α_1 -Chymotrypsin	"
α_1 -Makroglobulin	"
C_1 -Esteraseinaktivator	"
ϵ_1 -Aminocaprinsäure	
Trasytol	Bayer, Leverkusen
Kalcikrein-Trypsininhibitor (Laborpräparat)	
Pankreasinhibitor (PI)	Worthington Biochem. Corp., New Jersey, U.S.A.
1mg hemmt 1,1mg Trypsin	
Sojabohnen-Inhibitor (SBI)	
1mg hemmt 2,1mg Trypsin	
Limabohnen-Inhibitor (LBI)	
1mg hemmt 3,0mg Trypsin	
Ovomucoid	
1mg hemmt 1,0mg Trypsin	
Diisopropylfluorophosphat (DFP)	Merck, Darmstadt
N-Tosyl-L-Lysylchloromethyl- keton (TLCK)	
N-Tosyl-L-Phenylalanylchlor- methylketon (TPCK)	
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
P Chlormercuribenzoat	
2-Jodacetamid	Schuchard, München
Acetyl-L-Alanyl-L-Alanyl- L-Alanylchlormethylketon	Dr. Thomson, Lancaster, Eng- land

2. 2. 4 Analytische Reagentien

Phenolphthaleinglucomid	Serva, Heidelberg
Triton x 100 ($n \approx 10$)	
Polyäthylenglycol (Typ 20000)	
LDH-Testkombination	Boehringer, Mannheim
alkalische Phosphatase- Testkombination	
Eichproteine zur Molgewichts- bestimmung	
Echtviolettsalz B	Fluka, Buchs, Schweiz
Echtgranatsalz GBC	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz sowie alle Puffersubstanzen der p.a.-Qualität	

2. 2. 5 Reagentien für die Chromatographie

Sephadex G 25, G 75, G 100	Pharmacia, Uppsala, Schweden
CM-Sephadex C 50	
Agarose- ϵ -Aminocapryl-D-Tryptophanmethylester	Miles-Yeda Ltd., Rehovoth, Israel
Poröses Glas, CPG-10, 350 Å	Serva, Heidelberg
Visking-Dialysesschläuche	

2. 2. 6 Reagentien für Elektrophoresen

Acrylamid, reinst	Serva, Heidelberg
N, N' -Methylen-bis-acrylamid	
N, N', N'', N'''-Tetramethyl-äthylendiamin	
Coomassie Brillant Blau G250	
Bromphenolblau	
Natriumdodecylsulfat	
Ammoniumpersulfat	
Riboflavin	Merck, Darmstadt
Methylenblau	
Ampholine, pH=3-10 und pH=9-11	LKB, Bromma, Schweden
Agarose	L 'Industrie Biologique Francoise, Gennevilliers, Frankreich
CA-Elektrophoresefolien	Schleicher u. Schüll, Dassel

2. 2. 7 Reagentien für Zell-Isolierung und -Kultur

Heparin: Thrombo Vetren ^R	Promonta, Hamburg
Penicillin	Chemie Grünenthal, Stolberg
Streptomycin	Heyl, Berlin
TC Medium 199, 10x konzentriert, nach dem Verdünnen werden 100 000 E Penicillin und 100mg Streptomycin zugegeben (55).	DIFCO-Lab., Detroit, U.S.A.
Dextran, M _w ≈ 60 000; Macrodex ^R , 6 %	Knoll AG, Ludwigshafen
Ficoll, M _w ≈ 400 000	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ronpacon ^R , 75 % (Isopaque) 66,9g Ficoll werden in 913 ml a.dest gelöst, nach dem sterilisieren werden 140 ml Roupacon zugegeben.	Cilag-Chemie, Alsbach

Serum vom fötalen Kalb	Serva, Heidelberg
Bacto-Phytohämagglutinin P (PHA)	DIFCO-Lab., Detroit, U.S.A.

2. 2. 8 Reagentien für Granulozytenkulturen

Tetanus Toxoid (Ag)	Behringwerke, Marburg
Tetanus Antitoxin (AK)	
Der Antigen-Antikörper- Komplex (AgAK) wird durch Fällung im Äquivalenzbe- reich hergestellt.	
Lipopolysaccharid aus S. typhosa (LpS)	MPI für Immunbiologie, Freiburg
Polyinosyl-polytidylsäure (poly IC)	Boehringer, Mannheim

2. 2. 9 Sonstige Reagentien

Komplettes Freund'sches Adjuvans	Bio-Test, Frankfurt
Serumalbumin, human 20 %	Behringwerke, Marburg
Neuraminidase aus Vibrio cholerae	
Schafserythrozyten	
19 S-Antikörper gegen Schafs- erythrozyten von Kaninchen	Cordis-Lab., Miami, U.S.A.
7 S-Antikörper gegen mensch- liche Immunglobulin H-Ketten	Medac GmbH, Hamburg
Chloramin T	Merck, Darmstadt
125 J-Natrium-Jodid	Farbwerke Hoechst, Frankfurt
3 H-Thymidin	NEN-chemicals, Dreieichenhain
Omniflor	
Diaflo Membranen UM 2, PM10	Amicon, Oosterhout, Holland
Fluoreszeinmarkiertes Anti- serum gegen human IgG	Behringwerke, Marburg
Ampholine, pH 3 - 10 und pH 9 - 11	LKB, Bromma, Schweden
Tyrodellösung	0,25 % Rinderserumalbumin im 0,01 M Tris-HCl, pH 7,2 (17)

2. 3 ZELLMATERIAL

2. 3. 1 Isolierung polymorphkerniger und mononucleärer Leukozyten

Gesunden Spendern wurde aus einer Armvene 250 ml Blut entnommen und in heparinisiertem Fenwall-Blutbeuteln aufgefangen. Nach Verdünnen mit dem gleichen Volumen-Medium wurde das Blut in 50 ml Portionen auf je 50 ml Ficoll-Isopaque in dickwandigen Zentrifugenröhrchen geschichtet und bei 4⁰ und 2400 rpm für 20 min. zentrifugiert (56). Die mononucleären Leukozyten (Lymphozyten und Monozyten) sammelten sich an der Grenzschicht zwischen Ficoll und Medium. Sie wurden mit der Pipette abgesaugt und 3x mit Medium 199 gewaschen, wobei jedesmal in der Christzentrifuge 10 min. bei 800 Umdrehungen (250 g) abzentrifugiert wurde. Zum Schluß wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen, suspendiert und im Häemocytometer gezählt.

Die Granulozyten sammelten sich zusammen mit den Erythrozyten am Boden des Zentrifugenröhrchens an. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Erythrozyten durch eine Ammonchloridbehandlung lysiert (57) und Granulozyten durch 3maliges Waschen mit Medium 199 von Ficoll und Erythrozyten-Membranen befreit. Nach jeder Waschung wurde 10 min. in der Christkühlzentrifuge bei 800 Umdrehungen abzentrifugiert. Die gereinigten polymorphkernigen Leukozyten wurden in isotoner Kochsalzlösung suspendiert und ebenfalls im Häemocytometer gezählt. 10⁷-Zellen wurden zur Enzymbestimmung abgenommen und der Rest der Zellen zur Isolierung der Leukozytenproteasen entweder direkt weiterverarbeitet oder nach Abzentrifugieren bei -20⁰C eingefroren.

In einigen Versuchen wurde Venenblut in 40 ml Glasröhrchen aufgefangen, in denen 0,5 ml Heparin (1000 IE) und 5 ml Macrodex vorgelegt waren (58). Die Röhrchen wurden unter einem Winkel von 45⁰ bei 37⁰ C für 30 bis 90 min. stehen-

gelassen und das leukozytenreiche Plasma über den Erythrozyten abgehoben. Die zellulären Bestandteile wurden 10 min. bei 250 g abzentrifugiert und im gleichen Volumen-Medium wieder aufgenommen und einer Ficollzentrifugation unterworfen, wie oben beschrieben. Die hierbei gewonnenen Granulozyten enthielten nur wenige Erythrozyten, die durch einen hypotonen Schock (59) entfernt wurden.

Ammonchloridlyse der Erythrozyten

Das granulozyten- und erythrozytenenthaltene Sediment der Ficollzentrifugation wurde mit 7 Volumenteilen einer 0,75%igen Ammonchloridlösung in 0,02 molarem Tris-HCl-Puffer pH 8,5 suspendiert und 30 min. bei 4° C inkubiert (57). Danach wurde 10 min. bei 200 g abzentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung der Erythrozyten war es in einigen Fällen nötig, die Ammonchloridbehandlung zu wiederholen.

2. 3. 2 Isolierung von Lymphozyten und Monozyten

Jeweils 60 bis 90 x 10⁶ der durch Ficoll-Zentrifugation gewonnenen mononucleären Leukozyten wurden in einer Roux-Schale in Gegenwart von 100 ml Medium, das 30 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum und 40 % autologes Plasma sowie 1 % Penicillin und Streptomycin enthielt, für 2 Std. bei 37° C inkubiert. Die Monozyten hafteten am Boden der Glasflasche fest. Die Lymphozyten wurden vorsichtig abgegossen und durch 3maliges Waschen mit Medium serumfrei gewaschen und im Hämocytometer gezählt.

Zur Gewinnung der Monozyten wurden die Roux-Flaschen auf Eis gestellt. Durch Schütteln mit 50 ml kaltem PBS wurden die Monozyten abgelöst, 3x mit Medium gewaschen und im Hämocytometer gezählt.

Färbung der Zellausstriche (60)

2x10⁶ Zellen wurden in einem Tropfen 20%igem Serumalbumin aufgenommen und auf gelatinierten Objektträgern aus-

gestrichen. Nach Lufttrocknen wurden sie nach der Methode von PAPPENHEIM angefärbt. Zur Differenzierung der Leukozyten wurde in Granulozyten Peroxydase und alkalische Phosphatase, in Monozyten α -Naphthylacetatesterase histochemisch nachgewiesen.

Bestimmung der Zahl toter Zellen (61)

Die Zahl toter Zellen wurde durch Trypanblaufärbung bestimmt. Der kolloidale Farbstoff dringt nur in eine Zelle ein und färbt dann Bestandteile des Zellinneren an, wenn die Membran geschädigt ist. 10^7 -Zellen wurden in 1 ml 0,5 %iger Trypanblaulösung suspendiert und im Hämocytometer der Anteil angefärbter und somit toter Zellen ermittelt.

2. 3. 3 Isolierung von B- und T-Lymphozyten (62)

Die gereinigten Lymphozyten wurden mit Medium 199 auf 4×10^6 -Zellen pro ml eingestellt. Frischgewonnene Schafserythrozyten wurden 3x mit PBS gewaschen und als 5 %ige Suspension in Medium 199 aufgenommen. Pro ml Erythrozytensuspension wurden 12,5 E. Neuraminidase zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde 3x mit PBS gewaschen und eine 5 %ige Suspension in Medium 199 hergestellt. Gleiche Volumina der Lymphozytensuspension und der neuraminidasebehandelten Schafserythrozyten wurden gemischt und 15 min. bei 37°C im Wasserbad unter leichtem Schwanken inkubiert. Dann wurde bei 700 Umdrehungen für 10 min. in der Christzentrifuge abzentrifugiert und weitere 15 min. im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand abgegossen, das Sediment in 10 Volumen Medium 199 suspendiert und auf einen Ficoll-Gradienten aufgeschichtet und 25 min. bei 2400 rpm bei 4° zentrifugiert. Die B-Lymphozyten, die keine Erythrozyten anlagern, sammelten sich an der Zwischenschicht des Zentrifugenröhrchens an. Die T-Lymphozyten sammelten sich aufgrund der anhaftenden Erythrozyten am Boden des Zentrifugengläschens an und wurden nach Absaugen des Überstandes und hypotoner Lyse der Erythrozyten reingewonnen. Beide Lymphozytenpopulationen wurden 3x mit Medium 199 gewaschen und im Hämocytometer gezählt.

Die Trypanblaufärbung ergab in beiden Populationen mehr als 95 % lebender Zellen.

Zur Charakterisierung wurde in beiden Zellpopulationen das Vorhandensein von Oberflächenimmunglobulin mit fluoreszeinmarkierten Antisera (63) und die Fähigkeit mit Schafserythrozyten Rosetten zu bilden (siehe 2.7.2) untersucht.

2. 4 ANALYTISCHE METHODEN

2. 4. 1 Proteinbestimmungen

a) Bestimmungen mit dem Folin-Ciocalteus-Reagenz

Die Bestimmung erfolgte nach LOWRY in der Modifikation von GEIGER (64, 65). Die Proteinkonzentrationen wurden auf Rinder Serumalbumin als Standard bezogen. 10 µg Protein entsprachen einer Extinktion von 0,0755 bei 750 nm.

b) Mikrobiuretbestimmung (66)

1,0 ml Probe, die 0,1 - 2,0 mg Protein enthielt, wurde mit 1,0 ml 6 % NaOH gemischt und nach Zugabe von 0,1 ml Mikrobiuretreagenz 15 min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Extinktion bei 330 nm wurde gegen einen Pufferleerwert abgelesen. $E_{330}=1,000$ entsprachen einer Proteinmenge von 1,41 mg.

c) Biuretbestimmung

Diese Methode wurde zur Bestimmung der FITC markierten Proteine verwendet. Das Reagenz wurde entsprechend den Angaben von GORNALL (67) hergestellt. Die Messung wurde bei 560 nm durchgeführt.

2. 4. 2 Proteasebestimmung

a) Bestimmungen mit FITC markierten Proteinen

Darstellung von fluoreszeinmarkiertem Hämoglobin (68)

2,0 g Rinderhämoglobin wurden in 30 ml 0,166 M NaHCO_3 -Puffer pH = 9,0 gelöst und bei 4° C tropfenweise und unter starkem Rühren mit einer Lösung von 40 mg

Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) in 5 ml Aceton und 5 ml 0,166 M Carbonatpuffer, der erst kurz vor der Proteinmarkierung dazugegeben wurde, versetzt. Der Ansatz wurde bei 4° für 12 Std. weitergerührt und das FITC-markierte Hämoglobin durch Chromatographie an Sephadex G 25 von den nicht gebundenen Reaktionsprodukten befreit.

Säule: 2,0 x 40 cm

Puffer: 0,05 M Tris-HCl pH 7,5

Harnstoff-Alkali-Denaturierung nach Anson (69)

50 ml der FITC-Hämoglobininlösung wurden mit 4 ml 1 N Natrionlauge und 18 g Harnstoff versetzt und 1 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wurde mit 5,0 ml 1 M Na H₂PO₄ neutralisiert und nach Zugabe von 2,0 Harnstoff über Nacht gegen 4 M Harnstoff in 0,05 M Tris HCl pH 7,5 dialysiert. Das Substrat wurde bei -20° in Portionen eingefroren aufbewahrt und für den Test als 1%ige Lösung in 4 M Harnstoff in 0,05 M Tris-HCl pH 7,5 verwendet.

Testansatz

0,4 ml Enzymlösung in 0,05 M Tris-HCl pH 7,5, der 0,25 M NaCl enthielt, wurden mit 0,1 ml der 1%igen FITC-Hb-Lösung (Harnstoff-Alkali denaturiert) 1 Std. bei 30° C inkubiert. Nach Abstoppen mit 0,1 ml 1 %iger Albuminlösung und 0,1 ml 20 %iger TCA-Lösung wurde der Reaktionsansatz 30 min. ins Eisbad gestellt und das ausgefällte Protein 10 min. bei 2500 Upm in der Christzentrifuge abgeschleudert. 0,5 ml des Überstandes, der die TCA-löslichen Peptide enthielt, wurden mit 1,5 ml 0,133 N NaOH verdünnt (Endkonzentration 0,1 N NaOH) und die relative Fluoreszenz wurde im Eppendorf-Photometer mit Fluoreszenzaufsatz gemessen.

Anregungswellenlänge: 405 + 436 nm (Hg)

Sekundärfilter: 500 - 3000 nm

Die Ablesung erfolgt relativ zum Standard 106503 (Eppendorf) der auf Transmission 0,2 eingestellt wurde, entsprechend 20 relativen Fluoreszenzeinheiten (rel.Fl.E.).

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit des Testes und um einen Vergleich mit anderen Testmethoden zu ermöglichen, wurde Trypsin der Firma NOVO, batch 73 (23 Anson E/g) verwendet. Unter den angegebenen Testbedingungen ergaben 0,1 μ g (entsprechend 0,0023 mU nach Anson) eine Freisetzung von 48 rel.Fl.E.

Andere Proteinsubstrate

In Analogie zu Hämoglobin wurden Rinderfibrinogen, Casein, Hammersten und Rinderserumalbumin mit FITC markiert, jedoch nicht denaturiert und als 2 %ige Lösung in dem oben beschriebenen Test eingesetzt. Das F/P-Verhältnis der Substrate (Mol FITC pro Mol Protein) wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von proteingebundenem FITC von $7,5 \times 10^4 \text{ l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bei 493 nm und pH 13 bestimmt (70).

Es wurden folgende Werte ermittelt: Hämoglobin 5,4; Fibrinogen 19,2 ; Albumin 3,1; Casein 4,7.

Elastasebestimmung

Die Bestimmung erfolgte nach den Angaben von BANGA (71) durch Bestimmung des aus unlöslichem Elastin bei pH 7,5 freigesetzten Proteins.

2. 4. 3 Esterasebestimmungen

a) Elastaseähnliche Protease

Der Test wurde entsprechend der Methode von VISSER und BLOUT (72) mit folgenden Änderungen durchgeführt. 0,5 ml der Enzymprobe und 1,4 ml 0,05 M Tris HCl pH 7,5 wurden in der Küvette 5 min. bei 25° C äquilibriert und nach Zugabe von 0,1 ml BOC-Ala-ONp (4 mg/ml Aceton) wurde die Zunahme der Extinktion bei 405 nm im Eppendorf-Photometer mit einem Schreiber registriert. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde ein molarer Extinktionskoeffizient des p-Nitrophenols von $18\,500 \text{ l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ verwendet (73). In einem entsprechenden Versuchsansatz wurden die p-Nitrophenolester folgender N-substituierter Aminosäuren getestet: Glycin, Alanin, Isoleucin, Glutamin,

Tyrosin und Phenylalanin.

b) Chymotrypsinähnliche Protease

Die Bestimmung wurde in Abänderung der Methode von WARD und BECKER (42) durchgeführt.

Substrat: 1,0 mg Acetyl-L-Phenylalanin- β -Naphthylester in 1,0 ml Aceton: Dimethylsulfoxid = 2:1 gelöst und kurz vor Beginn des Testes mit 7 ml 0,05 M Tris HCl pH 7,5 verdünnt.

0,5 ml der Enzymprobe oder einer Verdünnung wurden 1 Std. bei 37°C mit 0,3 ml Substrat inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1,0 ml Aceton gestoppt; ein evtl. Proteinniederschlag wurde abzentrifugiert. Zur Azokupplung wurden 0,2 ml Echt-Violett-Salz B (4 mg/ml aqua dest) zu 1,0 ml Überstand gegeben und nach genau 4 min. wurde die Farbstoffbildung mit 0,5 ml 20 %iger TCA beendet. Die Extinktion bei 540 nm wurde gegen einen Puffer-Leerwert gemessen. Die Spaltung von Acetyltyrosin α thylester (ATEE) wurde über die Extinktionszunahme bei 253 nm gemessen (73).

c) Unspezifische Esterase (73)

0,5 ml der Enzymprobe wurden mit 0,3 ml Substrat (5 mg α -Naphthylacetat in 1 ml Aceton gelöst und kurz vor Testbeginn mit 19 ml 0,05 M Tris HCl-Puffer pH 7,5 verdünnt) 1 Std. bei 37°C inkubiert und analog b) weiterbehandelt.

2. 4. 4 Bestimmung von Marker-Enzymen

Die Latenz der Enzyme in den Lysosomen wurde durch Zusatz steigender Mengen von Triton X 100 und Messung der freiwerdenden Enzymaktivität untersucht. Für die Aktivitätsbestimmung während der Zellaufschlüsse wurde routinemäßig 0,1 % Triton X 100 zugesetzt (74).

a) β -Glucuronidase (73)

0,5 ml Probe, die 0,1 % Triton X 100 enthielt, wurde mit 0,3 ml 0,4 M Natriumacetatpuffer pH 4,0 und 0,05 ml Phenolphthaleinglucuronid (10 mM) für 1 - 3 Std. bei

37° C inkubiert. Danach wurde mit 1,5 ml 0,4 M Glycin NaOH-Puffer pH 10,4 die Reaktion gestoppt und das freigesetzte Phenolphthalein bei 550 nm gegen einen Leerwert gemessen.

b) Alkalische Phosphatase (73)

Die Bestimmung erfolgte mit der Boehringer-Test-Kombination mit Natrium-p-Nitrophenylphosphat in 50 mM Glycinpuffer pH 10,5 als Substrat.

c) Lactat-Dehydrogenase (73)

Die Bestimmung wurde mit der Boehringer-Test-Kombination mit Pyruvat als Substrat durchgeführt.

2. 4. 5 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennungen erfolgten im Colora-Ultraphorgerät (Plattengelelektrophorese nach S. NEES und W. SCHMIDT) in einer 3 mm Glaskammer bei 4° C.

a) Auftrennung saurer Proteine

Die Trennungen wurden in 7,5 %igem Polyacrylamidgelen unter Verwendung des Puffersystems von DAVIS (75, 76) durchgeführt. Als Elektrodenpuffer wurde wegen des geringeren Spannungsabfalls 0,04 M Tris-0,306 M Glycinpuffer pH 8,3 verwandt.

Verdünnte Proteinproben (Gesamtproteinmenge 5- 40 µg) wurden durch Dialyse gegen 20 %iges Polyäthylenglycol 20 000 auf 0,1 ml eingeengt und gegen 1:8 verdünnten Sammelgelpuffer dialysiert. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 5 µl 0,1 % Bromphenolblau und 20 µl Glycerin versetzt. Nach einer Trennzeit von 2 - 3 Std. bei 80 mA und 260 - 350 Volt wurde das Gel aus der Kammer gelöst und zur Lokalisierung von Protein- bzw. Enzymbanden spezifisch angefärbt.

b) Auftrennung basischer Proteine

Die Proteine wurden in einem Puffersystem analog REISFELD (77) in 7,5 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Die Endkonzentration der Puffer betrug:

Trenngel:	0,175 M Essigsäure - 0,060 M KOH, pH 4,3
Sammelgel:	0,087 M Essigsäure - 0,092 M KOH, pH 6,7
Elektrodenraum:	0,165 M Alanin - 0,026 M Essigsäure, pH 4,5

Die Proben wurden auf 0,1 ml eingeeengt und gegen 4 M Harnstoff in Sammelgelpuffer dialysiert. Vor dem Auftragen wurden 5 μ l 0,1 % Methylenblaulösung zugegeben. Nach Photopolymerisation des Sammelgels wurde das Elektrophoresegerät mit Elektrodenpuffer gefüllt und die Proben in die Geltaschen unterschichtet. Die Konzentrierung erfolgte bei 50 mA (80 - 130 Volt) während 60 min. Nach einer Trennzeit von 3 - 4 Std. bei 70 mA (180 - 260 Volt) wurde das Gel entsprechend den Versuchsbedingungen angefärbt.

c) Molekulargewichtsbestimmungen in SDS-Gelen

Die Auftrennungen erfolgten in 15 %igen Polyacrylamidgelen bei 20° C in Gegenwart von 0,1 % SDS. Wegen der kürzeren Trennzeiten wurden folgende Pufferkonzentrationen im kontinuierlichen System nach WEBER und OSBORN (78) verwendet:

Trenngel:	0,03 M Na-Phosphatpuffer pH 7,1
Probe:	0,0075 M " "
Elektrodenraum:	0,1 M " "

Die Proteinprobe mit 5 - 20 μ g Protein wurde in 2 %iger SDS-Lösung denaturiert und gegen 0,0075 M Na-Phosphatpuffer pH 7,1 dialysiert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden 5 μ l 0,1 % Bromphenolblaulösung und 20 μ l Glycerin zugegeben. Die Auftrennung erfolgte bei der konstanten Stromstärke von 50 mA (150 - 200 Volt) für 5 Std. Nach der Auftrennung wurde das Gel über Nacht in 20 %iger Trichloressigsäure fixiert und angefärbt. Die relative elektrophoretische Beweglichkeit der Probe wurde mit der von Eichproteinen verglichen, die im gleichen Gel elektrophoriert wurden.

d) Isoelektrische Focussierung

Die Auftrennungen wurden in 7,5 % igen, Ammonpersulfat-polymerisierten Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die verwendeten Ampholyte der pH-Bereiche 3 - 10 und 9 - 11 wurden entsprechend der Herstellervorschrift verdünnt und in einigen Versuchen im Verhältnis 1 : 3 gemischt.

Anodenlösung (oben) : 0,01 M Essigsäure

Kathodenlösung (unten): 0,1 N NaOH

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurden die Enzyme in der Celluloseacetatelektrophorese im pH-Bereich 8,0 - 10,8 bei der Ionenstärke 0,1 M aufgetrennt und die Wanderungsstrecken gegen das pH aufgetragen.

e) Anfärbung der Gele

Proteinfärbung (79)

Die Gele wurden in 100 ml 12,5 %iger Trichloressigsäure fixiert und nach Zugabe von 2 ml einer 0,25 %igen Coomassie Blue G 250 Lösung 1 Std. angefärbt. Zur Intensivierung der Banden und zur Lagerung wurden die Gele in 7,5 %ige Essigsäure gelegt.

Proteasefärbung

Zur direkten Darstellung von proteolytischen Aktivitäten im Gel wurde dem flüssigen Trenngel 1,5 mg Rinderfibrinogen/ml Gel beigemischt. Nach der Auftrennung wurde das Gel für 1 Std. in der Kälte und weitere 12 Std. bei 37°C in 0,2 M Trispuffer pH 7,5 inkubiert. Danach wurde es in 12,5 %iger Trichloressigsäure fixiert und mit Coomassie Blue G 250 angefärbt. Die Positionen von proteolytischen Enzymen deuteten sich durch eine helle Lysiszone auf einem blauen Untergrund an.

Esterasefärbung (80)

Das Gel wurde in der Kälte für 1 Std. mit 0,2 M Trispuffer pH 7,5 Äquibriert und für 1 - 4 Std. in 100 ml Färbelösung inkubiert, die das spezifische Substrat

und 75 mg Echt Granatsalz GBC in 0,05 M Trispuffer pH 7,5 enthielt. Die Färbelösungen wurden immer frisch angesetzt und kurz vor Gebrauch filtriert.

Folgende Substrate wurden verwendet:

Acetyl-L-Alanin- α -Naphthylester (20 mg in 5 ml Aceton)

Acetyl-D,L-Phenylalanin- β -Naphthylester (15 mg in 3 ml DMSO und 3 ml Aceton).

2. 4. 6 Immunologische Verfahren (81)

a) Immunisierung von Kaninchen *

Am Tage 1, 2, 3, 4, 8, 16 und 30 wurde erwachsenen männlichen Kaninchen jeweils ein Gemisch von 0,5 ml Protease (10 - 20 μ g Protein) und 0,5 ml komplettem Freund'schen Adjuvans in die Hinterläufe i.m. injiziert. Der Anstieg des Antikörpertiters wurde durch eindimensionale Immundiffusion nach OCHTERLONY verfolgt. Am 40. Tage wurde das Blut der Tiere durch Herzpunktion gewonnen und das Serum bei -70° C eingefroren. Als Titer wurde die Verdünnung des Antiserums angegeben, die bei gleicher Antigenmenge in der eindimensionalen Immundiffusion noch einen sichtbaren Präzipitationsbogen ergab.

b) Immundiffusion nach OCHTERLONY

Für Versuche mit dem Antiserum gegen die gereinigten Leukozytenproteasen wurde 4,0 ml 1,5 %ige Agarose in 50mM Na HCO₃ (82) bei 56° C auf 2,5 x 7,5 cm Objektträger gegossen. Nach dem Gelieren wurden Antigen und Antiserum zur Ausbildung der Präzipitationslinien 24 Std. gegeneinander diffundieren lassen.

* Herrn Prof. Geier, Zool. Institut, Marburg, danke ich für die freundliche Überlassung von 4 Kaninchen und Herrn Dr. Manteuffel für die Hilfe bei der Immunisierung und der Blutabnahme.

c) Radiale Immundiffusion

Die quantitative Bestimmung von Humanplasminogen und Fibrinogen durch radiale Immundiffusion wurde mit Partigenplatten der Behringwerke, Marburg durchgeführt. Das Quadrat des Durchmessers des Präzipitationsringes ist der Proteinkonzentration direkt proportional.

d) Immunelektrophorese

Die Auftrennungen erfolgten auf 2,5 x 7,5 cm Objektträgern in 1 %iger Agarose in 50 mM Na HCO₃ (82) (4 ml) bei 200 Volt 1 Std. Nach 24-stündiger Diffusion gegen 0,2 ml Antiserum wurde 36 Std. lang nicht präzipitiertes Protein mit physiologischer NaCl ausgewaschen und nach Trocknen der Agarose mit Coomassie Blue R 250 in Äthanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 45 : 10 : 45 angefärbt.

e) Zweidimensionale Immunelektrophorese (83)

Die Methode beruht darauf, daß die Antigenprobe zuerst in einer Dimension elektrophoretisch aufgetrennt wird und anschließend durch Elektrophorese senkrecht zur ersten Richtung in ein antikörperhaltiges Gel wandert, in dem es zur Ausbildung scharfer Präzipitationslinien in Form von "Raketen" kommt. Die Fläche unter diesen Linien ist der Proteinmenge proportional.

Die Auftrennung erfolgte in 1 %iger Agarose in 0,075 M Barbitallpuffer pH 8,6 auf 5 x 5 cm Glasplättchen. In der ersten Dimension wurde 2 Std. bei 190 Volt aufgetrennt. Für die zweite Dimension wurde entweder 0,3 ml Anti- α_1 -Antitrypsin oder 0,2 ml Antiproteaseserum in den 3,7 cm breiten Gelstreifen eingebracht und 18 Std. bei 130 Volt elektrophoriert. Dann wurde analog c) gespült, getrocknet und angefärbt.

2. 4. 7 Auswertung der kinetischen Experimente

Die gemessenen Aktivitäten wurden auf die Enzymmenge (μ g) bezogen, stellen also spezifische Aktivitäten dar. Die Daten wurden in LINEWEAVER-BURK-Diagrammen doppelt

reziprok aufgetragen. Die kinetischen Parameter wurden daraus nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet.

2. 5 ENZYMPRÄPARATION

2. 5. 1 Zellfraktionierung und Granulaextraktion

Granulozyten wurden nach 2.3.1 gewonnen und sofort einer Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation unterworfen. In späteren Versuchen wurden sie im Sediment rasch eingefroren bei -20°C und die Zellen mehrerer Präparationen gemeinsam aufgearbeitet. Der Aufschluß und die nachfolgenden Zentrifugationen erfolgten bei 4°C . Granulozyten mit einer Reinheit von mindestens 95 % wurden in 0,34 M Saccharose pH 8,0 in einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml suspendiert und in Potter-Elvehjem-Homogenisator mit einem Teflon-Stempel bei 2000 Upm aufgeschlossen (31). Zellkerne und nicht aufgebrochene Zellen wurden bei 500 g für 10 min. abzentrifugiert und zweimal mit 0,34 M Saccharose reextrahiert. Die primären Granula wurden bei 4 000 g für 20 min. abzentrifugiert und die sekundären Granula 20 min. bei 25 000 g aus dem Überstand abgeschleudert und mit Saccharoselösung gewaschen. Die primären Granula von 10^9 Zellen wurden in 2,5 ml aqua dest suspendiert und durch dreimaliges Frieren und Tauen (Aceton-Trockeneis) aufgebrochen. Dann wurde 2,5 ml 2 M NaCl in 0,1 M Trispuffer pH 7,5 zugegeben und nach 10-minütigem Stehen bei Zimmertemperatur für 10 min. bei 18 000 g abzentrifugiert. Die Extraktion mit der 1 M NaCl-Lösung wurde zweimal wiederholt und die vereinigten Extrakte durch Ultrafiltration über Diaflo-PM 10-Membranen auf 5 ml eingengt. Ein Aliquot der subzellulären Fraktionen und der Granulaextrakte wurden für Protein- und Enzymbestimmungen abgenommen.

2. 5. 2 Chromatographische Verfahren

a) Sephadex Gelfiltration

Eine 2,5 x 90 cm Glassäule wurde mit Sephadex G 100 bzw. Sephadex G 75 gefüllt und gegen 0,05 M Trispuffer pH 7,5 mit 1 M NaCl bei 4° C äquilibriert. Der Granulalextrakt oder eine Enzymfraktion (5 ml) wurde bei einem Durchfluß von 0,45 ml/min. aufgetrennt. Das Eluat wurde in 10 min. Fraktion aufgefangen und die Absorption bei 280 nm sowie proteolytische und esterolytische Aktivität gemessen.

b) Ionenaustauschchromatographie

Eine 1,5 x 30 cm Glassäule wurde mit CM-Sephadex C 50 entsprechend der Herstellervorschrift gefüllt und gegen 0,05 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,0 äquilibriert, der 0,2 M NaCl enthielt. Die gegen denselben Puffer dialysierte Enzymprobe wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,15 ml/min. auf die Säule aufgetragen und mit einem Säulenvolumen des Startpuffers nachgespült. Danach wurde mit 150 ml eines linearen Kochsalzgradienten von 0,2 bis 1,0 M in Phosphatpuffer eluiert. Die Linearität des Gradienten wurde durch Natrium-Bestimmung durch Flammenphotometrie überprüft. Im Eluat wurde die Absorption bei 280 nm sowie Protease- und Esterase-Aktivität gemessen.

2. 6 FREISETZUNG DER PROTEASEN AUS GRANULOZYTEN IN VITRO

a) Kurzzeitkulturen von Granulozyten

Granulozyten wurden nach 2.3.1 oder über Nylonwattensäulen gewonnen und in kalter Tyrodelösung (17) zu 5×10^7 Zellen/ml suspendiert. 0,2 ml der Zellsuspension wurden mit 1,0 ml Tyrodelösung und 0,2 ml des jeweiligen Stimulans unter leichtem Schütteln für 60 min. bei 37° C in Linbro-Gewebekulturplatten inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10 min. bei 250 g abzentrifugiert und im

Überstand die Aktivität von Protease, Esterase, lyso-somalen und cytoplasmatischen Marker-Enzymen gemessen (vergl. 2.4.2 - 4). Diese Aktivität wurde in Prozent der durch Lysieren mit 0,1 % Triton X 100 freisetzbaren Gesamtaktivität angegeben.

Als Stimulantien wurden Phythaemagglutinin aus *Phasaeolus vulgaris* (PHA) sowie die unter 2.2.8 angegebenen Reagentien verwandt.

b) Inkubation auf nicht phagocytierbaren Oberflächen (17)

Milliporefilter mit 0,45 μ m Porenweite (25 mm Durchmesser) wurden zuerst für 30 min. in Tetanus-Toxoid-Lösung und anschließend für 60 min. in der Antitoxinlösung inkubiert. Als Kontrollen wurden Filter nur mit Toxin (Ag) bzw. Antitoxin (Ak) inkubiert. Für den Ansatz wurden 10^7 Granulozyten in 0,5 ml Tyrode durch milden Sog mit der Wasserstrahlpumpe auf die Filter gebracht, die sodann in 2,5 ml Tyrodelösung gelegt und für 15 - 60 min. bei 37° C inkubiert wurden. Die Überstände wurden abgehoben und nach 10 min. Zentrifugieren bei 500 g auf Enzymfreisetzung untersucht wie unter a) beschrieben.

2. 7 EINWIRKUNG DER PROTEASEN AUF LYMPHOZYTEN

2. 7. 1 Lymphozytenkultur

a) Periphere Blutlymphozyten des Menschen (84)

Lymphozyten wurden über definierte Zeiträume mit verschiedenen Konzentrationen der gereinigten Proteasen inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Serum gestoppt. Danach wurde das Mitogen zugegeben, für 62 Std. kultiviert und die DNS-Syntheserate gemessen. Alle Ansätze erfolgten steril.

$1,5 \times 10^6$ Lymphozyten in 1,0 ml Medium 199 wurden mit 0,10 ml Proteaselösung für 0 - 120 min. bei 25° C inkubiert. Nach Stoppen der Proteolyse mit 1,0 ml 30 %igem AB-Serum in Medium 199 wurde 0,1 ml PHA (2,5 μ g) in

physiologischer Kochsalzlösung zugegeben. Die Ansätze wurden bei 37° C in einer wassergesättigten Sauerstoffatmosphäre inkubiert, die 5 % CO₂ enthielt. Nach 62 Std. wurde 0,1 ml ³H-Thymidin (4 µCi, spezifische Aktivität 336 mCi/mM) zugegeben und die Zellen weitere 4 Std. inkubiert. Dann wurden die Ansätze im Eisbad abgekühlt und die Zellen über Sartorius-Glasfaserfilter abfiltriert. Es wurde zweimal mit jeweils 10 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen, mit 5 %iger Trichloressigsäure fixiert und mit Methanol nachgespült. Nach dem Trocknen wurden die Filter in 10 ml Toluolscintillator (4 g Omniflor/1 Tolnol) aufgelöst und im Scintillationszähler der Tritiumeinbau gemessen.

Für jeden Meßwert wurde der Mittelwert von 3 Kulturen verwandt. Die Stimulierungsrate wurde auf Parallelansätze bezogen, die anstatt Protease 0,05 M Trispuffer pH 7,5 mit 0,5 M NaCl enthielten.

In Kontrollexperimenten wurden

- 1) die Proteasen mit AB-Serum und anderen Inhibitoren vorinkubiert
- 2) die Proteasen mit dem Mitogen vorinkubiert
- 3) die Lymphozyten nach Stoppen der Proteaseaktivität mit Serum gewaschen und in 10 ml Medium 199, das 15 % AB-Serum enthielt, resuspendiert
- 4) die Proteolyse durch Zugabe von Kallikrein-, Sojabohnen-Inhibitor oder α_1 -Antitrypsin gestoppt.

b) Lymphknotenzellen der Maus (85)

BDFI-Mäuse * wurden durch cervikale Dislokation getötet. Unter sterilen Bedingungen wurden die Peritoneallymphknoten entnommen, auf einem feinen Stahlsieb vorsichtig zerrieben und mit Medium 199 ausgespült. Die suspendierten Zellen wurden in einem Zentrifugenglas für 5 min. in Eis gestellt, damit sich die groben Fragmente absetzen konnten.

* Die BDFI-Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. Hartmann, MPI für Virusforschung, Tübingen zur Verfügung gestellt.

Die überstehende Zellsuspension wurde bei 4°C und 100 g für 10 min. zentrifugiert und nach nochmaligem Waschen des Sediments mit Medium 199 suspendiert. Die Zellzahl wurde am Coulter Counter ermittelt und auf $3 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt, nachdem vorher essentielle Aminosäuren und Antibiotica zugegeben worden waren.

Der Kulturansatz erfolgte in Linbro-Kulturplatten. 0,4 ml der Lymphozytensuspension (entspr. $1,2 \times 10^6$ Zellen) wurde mit 50 μl Proteaselösung der entsprechenden Konzentration bei 37°C für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl 10 % fötalem Kälberserum gestoppt. Nach Zugabe von 50 μl LPS (5 μg) bzw. 50 μl 10^{-2} M Cystein wurde unter leichtem Schwenken bei 37°C in einer 5 % CO_2 -Sauerstoffatmosphäre inkubiert. Nach 44 Std. wurde 1 μCi ^3H -Thymidin zugegeben und nach 48 Std. wurden die Zellen wie unter a) beschrieben geerntet.

2. 7. 2 Wirkungen auf Rezeptoren von T-Lymphozyten

a) Rosettenbildung mit Schafserythrozyten (E-Rosetten) (86, 62)

$1,5 \times 10^6$ Lymphozyten in 1 ml Medium 199 wurden für unterschiedliche Zeiten zusammen mit 0,1 ml Protease inkubiert und die Reaktion mit 1 ml Medium 199, das 20 % autologes Serum enthielt gestoppt. Die Zellen wurden 3mal mit Medium 199 gewaschen (10 min., 200 g) und schließlich in 0,5 ml Medium 199 suspendiert.

Schafserythrozyten wurden 3mal mit PBS gewaschen und zu 5 % in Medium 199 suspendiert (etwa 6×10^7 Zellen/ml). 0,5 ml dieser Erythrozytensuspension wurde zu 0,5 ml Lymphozytensuspension gegeben und 15 min. bei 37°C unter leichtem Bewegen inkubiert. Nach 10 min. Zentrifugieren bei 700 Upm (Christzentrifuge) wurde weitere 15 min. im Kühlschrank inkubiert. Dann wurde der Überstand abgegossen und die Zellen in einem Tropfen 20 %igem Albumin resuspendiert und im Hämocytometer

gezählt. Als rosettenbildende Lymphozyten wurden solche definiert, die drei oder mehr Schafserythrozyten gebunden hatten. Sie wurden als Prozent der Gesamtlymphozyten angegeben. Kontrollen ohne Enzymbehandlung wurden mit Puffer angesetzt.

b) Rosettenbildung mit neuraminidasebehandelten Schafserythrozyten (EN-Rosetten) (62)

Schafserythrozyten wurden mit Neuraminidase behandelt wie unter 2.3.2 beschrieben.

Die proteolytische Behandlung der Lymphozyten und die Rosettenbildung wurde entsprechend den Angaben unter a) durchgeführt.

2. 7. 3 Wirkung auf Rezeptoren von B-Lymphozyten

2. 7. 3. 1 Oberflächen-Immunglobuline (90)

Polyvalentes Kaninchen-Antiserum gegen die schweren Ketten von IgG, IgM, IgA wurde durch Sephadex-Chromatographie gereinigt (88) und die IgG-Fraktion nach der Chloramin T-Methode mit ^{125}J markiert (89). Nicht gebundenes Jod wurde durch Sephadex G 25 Filtration abgetrennt. Wenigstens 95 % der am Antikörper gebundenen Radioaktivität waren mit 5 % Trichloressigsäure fällbar. Die spezifische Aktivität betrug 1,5 - 3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein.

2×10^6 Lymphozyten in 0,5 ml Medium 199 wurden mit 0,1 ml der beiden Leukozytenproteasen bzw. Puffer inkubiert und nach unterschiedlichen Zeiträumen wurde 1 ml 20 %iges AB-Serum in Medium 199 zugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit Medium 199 wurden die Zellen in 0,5 ml Medium suspendiert. Nun wurden 0,05 ml des ^{125}J markierten Antikörpers zugegeben und im Eisbad für 30 min. inkubiert. Danach wurde dreimal mit Medium 199 gewaschen und die Zellen in einem Tropfen 20 % Rinder-serumalbumins suspendiert und auf gelatinisierten Objektträgern ausgestrichen.

Autoradiographien wurden nach der Dipping-Film-Technik hergestellt. Die Ausstriche wurden für 24 Std. in Methanol fixiert, mit Ilford G 5-Emulsion überzogen und nach dem Trocknen für 7 Tage im Dunkeln inkubiert. Danach wurden sie mit Ilford ID 19 entwickelt und mit gepufferter Giemsa-Lösung (pH 5,8) angefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Prozentsatz der markierten Zellen wurde als Mittelwert zweier identischer Ansätze angegeben.

2. 7. 3. 2 Komplementrezeptorrosetten

Zur Untersuchung der Proteasewirkung auf C_3 -Rezeptoren von Lymphozyten wurde die Methode von BIANCO und NUSSENZWEIG (91) verwendet. 2×10^6 Lymphozyten wurden wie unter 2.7.3.1 mit den Proteasen behandelt und nach dem Waschen in Medium 199 suspendiert.

Bereitung des Erythrozyten-Amborezeptor (EA)-Komplexes

Schafserythrozyten wurden dreimal mit PBS gewaschen und zu einer 5 %igen Suspension in Medium 199 aufgeschwemmt. Gleiche Volumina (10 ml) einer 5 %igen Suspension gewaschener Schafserythrozyten und Amborezeptor (19 S Immunglobulin aus Kaninchen gegen Schafserythrozyten in der nicht mehr agglutinierenden Verdünnung von 1 : 250 mit PBS) wurden gemischt und unter leichtem Bewegen für 30 min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde der EA-Komplex dreimal mit Medium 199 gewaschen und das ursprüngliche Volumen (10 ml) wieder eingestellt.

Bereitung des EAC-Komplexes

Gleiche Volumina von EA-Suspension (10ml) und Komplement C (frisches menschliches Serum in einer Verdünnung von 1 : 100, die gerade nicht mehr lysierend wirkte) wurden 30 min. bei 37°C inkubiert, dreimal mit Medium 199 gewaschen und auf 10 ml eingestellt.

Rosettenbildung der Komplementrezeptor-Lymphozyten

2×10^6 enzymbehandelte bzw. Kontroll-Lymphozyten in 0,2 ml Medium 199 und 0,2 ml EAC-Suspension wurden in Plastikpetrischalen (Durchmesser 2,5 cm) unter leichtem Schütteln für 1/2 Std. bei 37°C inkubiert und danach eine weitere Stunde auf Eis gestellt. Dann wurden die Zellen vorsichtig suspendiert, mit Medium 199 1 : 5 verdünnt und im Hämocytometer der Prozentsatz rosettenbildender Lymphozyten ermittelt.

2. 7. 4 Mitogenbindung der Lymphozyten

Die Beeinflussung der Mitogenbindung von Lymphozyten durch Leukozytenproteasen wurde mit ^{125}J markiertem Phythämagglutinin untersucht, das nach BYRT (89) markiert wurde.

0,6 ml PHA (10 mg/ml PBS) wurden mit 15 mCi ^{125}J -NAJ in 45 μl (spezifische Aktivität 8 - 15 Ci ^{125}J /mg J) und 50 μl Chloramin T (1 mg/ml H_2O) für 2 min. inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (1 mg/ml H_2O) gestoppt. Nicht proteingebundenes NAJ wurde durch Sephadex G 25 Filtration abgetrennt. Die relative spezifische Aktivität des Jod markierten Mitogen betrug 130500 ipm/ μg Protein.

2×10^6 Lymphozyten in 0,5 ml Medium 199 wurden 0,1 ml Proteaselösung für 5 bzw. 50 min. inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml 20 %iges AB-Serum gestoppt. Dann wurde 0,1 ml ^{125}J -PHA der entsprechenden Konzentration zugegeben und 30 min. im Eisbad inkubiert. Durch Absaugen über das SKATRON-Vielfach-Filtrationsgerät und Waschen mit kalter physiologischer Kochsalzlösung wurde freies Mitogen abgetrennt. Die Lymphozyten auf den Filterplättchen wurden in 1,0 ml 10 % Na_2CO_3 in 0,5 N NaOH aufgelöst und die Radioaktivität im Gamma-zähler gemessen. Die Radioaktivität wurde auf gleiche Proteinmenge bezogen.

Die Auswertung erfolgte im SCATCHARD-plot (92) entsprechend der Formel $\frac{b}{f} = K \times (q-b)$, mit

q = Konzentration der Bindungsstellen für PHA

b = " " des gebundenen PHA

f = " " des freien PHA

K = Assoziationskonstante

2. 8 PROTEOLYSE VON FAKTOREN DES BLUTGERINNUNGSSYSTEMS

a) Einwirkung auf gereinigte Gerinnungsfaktoren

Die gereinigten Gerinnungsfaktoren wurden soweit verdünnt, daß sie mit den verwendeten Mangelseren Gerinnungszeiten von 35 - 40 sec. ergaben. 1,0 ml des Faktors wurde mit 0,1 ml der Leukozytenprotease (2 μ g) inkubiert und zu den angegebenen Zeiten 0,1 ml zur Aktivitätsbestimmung entnommen. Die α_1 -Antitrypsinkonzentration der Mangelseren reichte in allen Fällen aus, die Protease völlig zu hemmen.

b) Inkubationsansatz mit Plasma

1,0 ml Citratplasma wurde bei 37° C mit 10 bzw. 100 μ g Leukozytenprotease in 4 ml Barbital-Acetatpuffer pH 8,4 zusammengegeben und weitere 10 min. bei 37° C inkubiert.

c) Testansätze

Die Faktoren II und V des exogenen Gerinnungssystems wurden mit Reagentien der Behringwerke, Marburg, bestimmt.

0,1 ml des Reaktionsansatzes wurde mit 0,1 ml des spezifischen Mangelplasmas für 30 sec. bei 37° C inkubiert und nach Zugabe von 0,2 ml Calcium/Thromboplastin die Gerinnungszeit am Schnittger-Apparat bestimmt.

Die Gerinnungsfaktoren VIII und XII des endogenen Systems wurden mit Reagentien der Fa. Dade bestimmt.

0,1 ml des 1 : 4 verdünnten Reaktionsansatzes wurden mit 0,1 ml des spezifischen Mangelserums und 0,1 ml aktiviertem Cephaloplastin 2 min. bei 37° C vorinkubiert.

Nach Zugabe von 0,1 ml 0,02 M Calciumchlorid wurde die Gerinnungszeit bestimmt.

Fibrinogen wurde durch radiale Immundiffusion mit Partigenplatten der Behringwerke, Marburg, bestimmt.

Factor XIII wurde, wie vor kurzem beschrieben, über seine Transglutaminaseaktivität durch Einbau von ^{14}C Putressin in Casein bestimmt (93).

3 ERGEBNISSE

3. 1 VORKOMMEN NEUTRALER PROTEASEN

3. 1. 1 Leukozytensubpopulationen

Die durch Ficollgradientenzentrifugation (siehe 2.3.1) isolierten Granulozyten waren mehr als 95 % rein. Die mononucleären Leukozyten bestanden zu etwa 80 % aus Lymphozyten und zu etwa 20 % aus Monozyten (Tab.1). Proteaseaktivität bei neutralem pH sowie Esteraseaktivität gegen BOC-Ala-ONp und Ac-Phe-ONaph waren ausschließlich in der Granulozytenfraktion vorhanden, während die unspezifische Esterase sich vorwiegend bei den mononucleären Leukozyten fand.

Tab. 1: Vorkommen neutraler Proteasen in Leukozyten Subpopulationen. Periphere Blutleukozyten wurden durch Ficollzentrifugation in Granulozyten und mononucleäre Leukozyten der angegebenen Reinheit aufgetrennt. Die Differenzierung erfolgte durch histochemische Färbung; G: Granulozyten, L: Lymphozyten, M: Monozyten; ⁶(n = 10). Protease- und Esteraseaktivität wurde in je 10⁶ Zellen wie unter 2.4.2,3 beschrieben, gemessen.

	Reinheit ⁺ G L M (%) ⁺			neutrale Protease (rel. Fl. E/U)	BOC-Ala-ONp Esterase ($\Delta E_{405}/\text{min}$)	Ac-Phe-ONaph Esterase ($\Delta E_{540}/15\text{min.}$)	unspez. Esterase ($\Delta E_{540}/15\text{min.}$)
Granulozyten	95,2	4,0	0,8	327 [±] 90	0,148 [±] 0,067	0,525 [±] 0,324	0,053 [±] 0,016
Mononucleäre Leukozyten	2,0	77,8	20,2	18 [±] 20	0,017 [±] 0,008	0,075 [±] 0,041	0,105 [±] 0,030

3. 1. 2 Verteilung auf subzelluläre Fraktionen

Granulozyten wurden in Potter-Elvehjem-Homogenisator aufgebrochen und durch differentielle Zentrifugation in die Kernfraktion, die lysosomale oder Granulafraktion und die Überstandsfraktion aufgetrennt. Die primären (Marker: β -Glucuronidase) und die sekundären Granula (Marker: alkalische Phosphatase) ließen sich auf diese Weise nicht auftrennen. Die subzelluläre

Verteilung der neutralen Protease entsprach derjenigen der β -Glucuronidase (Abb.1). Durch Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten konnte gezeigt werden, daß die neutralen Proteasen wie β -Glucuronidase ausschließlich in den primären Granula vorkommen. Erst oberhalb von 0,02 % Triton X 100 waren beide Enzyme für die Substrate voll zugänglich. Sie sind also in den Lysosomen latent.

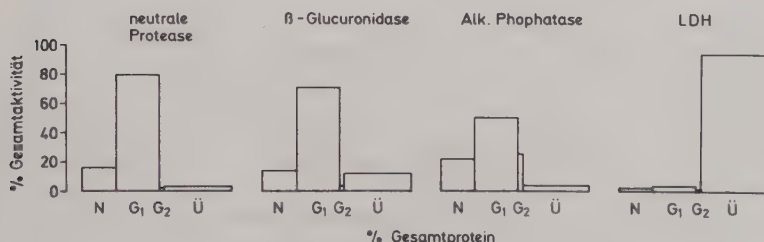


Abb. 1: Verteilung von neutraler Protease, β -Glucuronidase, alkalische Phosphatase und Lactatdehydrogenase auf subzelluläre Fraktionen von Granulozyten. N: Kernfraktion (500 g x 10 min), G₁: Granulafr. I (4000 g x 20 min), G₂: Granulafr. II (25000 g x 20 min), Ü: Überstand der 25000 g x 20 min -Zentrifugation. Protein-gehalt und Aktivität der Fraktionen wurde auf die Summe aller Fraktionen bezogen.

3. 2 REINIGUNG DER PROTEASEN

3. 2. 1 Granulaextraktion

Durch Extraktion der durch dreimaliges Frieren und Tauen aufgebrochenen Granula mit Aqua dest. wurde ein Drittel des Proteins entfernt, darunter auch β -Glucuronidase, während die neutrale Protease und die beiden Esterasen noch fest in den Granula gebunden waren (Abb.2).

In Gegenwart von 1 M NaCl konnten diese Enzyme extrahiert werden.

3. 2. 2 Säulenchromatographie

a) Sephadex G 100 Chromatographie

Das Elutionsprofil der Sephadex G 100 Auftrennung

des Granulaextraktes polymorphkerniger Leukozyten ist in Abb.3 wiedergegeben. Protease- und Esteraseaktivität wurden in einem breiten Gipfel im Molekulargewichtsbereich 10000 bis 40000 Dalton eluiert und von der Hauptmenge des Begleitproteins mit einem Molekulargewicht >60000 Dalton abgetrennt. Die hochmolekulare Fraktion, die eine geringe Esteraseaktivität gegenüber dem Chymotrypsinsubstrat zeigte, wurde nicht weiter aufgetrennt.

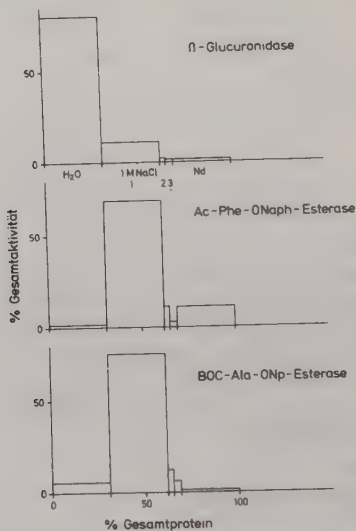


Abb. 2: Extraktion von β -Glucuronidase, chymotrypsin-ähnlicher und elastaseähnlicher Esterase aus lysosomalen Granula von Granulozyten. Die Granula wurden durch Frieren-Tauen (3x) aufgeschlossen und 1x mit A. dest. sowie 3x mit 1 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl, pH = 7,5 extrahiert. Nd: Sediment nach der 4. Extraktion im Ausgangsvolumen suspendiert. Proteingehalt und Aktivität der Einzel-extrakte wurden auf die Summe aller Fraktionen bezogen.

b) Kationenaustauschchromatographie

Die niedermolekulare Fraktion mit Protease- und Esteraseaktivität wurde auf CM-Sephadex C 50 mit einem linearen Salzgradienten in zwei unterschiedlichen Enzymaktivitäten

aufgetrennt (Abb.4). Bei 0,46 M NaCl wurde die Protease I eluiert, die aufgrund ihrer Spaltung von BOC-Ala-ONp und von Elastin als elastaseähnliche Protease (ELP) bezeichnet wurde. Bei 0,78 M NaCl wurde die Protease II eluiert. Sie spaltete Ac-Phe-ONaph und wurde als chymotrypsinähnliche Protease (CLP) bezeichnet.

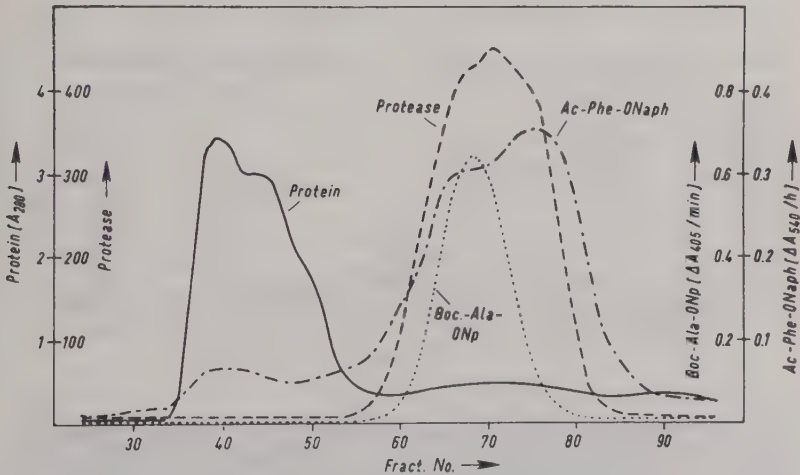


Abb. 3: Sephadex G 100 Chromatographie von 5,0 ml konzentriertem Granulaextrakt (52 mg Protein). Säule 2,5 x 90 cm; Puffer: 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,0 M NaCl; Fraktionsvolumen: 4,5 ml. In den Fraktionen wurde die optische Dichte bei 280 nm (—), Proteaseaktivität mit F-Hb-denat (---) und Esteraseaktivität gegen BOC-Ala-ONp (...) und Ac-Phe-ONaph (-·-·) gemessen (vgl.2.4.2,3).

c) Gelfiltration über Sephadex G 75

Die durch den vorhergehenden Reinigungsschritt erhaltene BOC-Ala-ONp-Esterase wurde nach Chromatographie an Sephadex G 75 als homogener Peak eluiert (Abb.5a). Fibrinogen- Hämoglobin- und Elastin-spaltende Aktivität sowie die Esteraseaktivität erscheinen in einem symmetrischen Gipfel entsprechend einem Molekulargewicht von 27000 Dalton. Die von der CM-Sephadex-Säule eluierte Ac-Phe-ONaph-Esterase wurde bei der Rechromatographie über

Sephadex G 75 von einem höher molekularen, inaktiven Proteingipfel abgetrennt (Abb.5b). Esterase- sowie Hämoglobin- und Fibrinogen-spaltende Aktivität fanden sich nur im 2. Gipfel mit einem Molekulargewicht von 18000 Dalton. Elastaseaktivität wurde in keinem der beiden Gipfel nachgewiesen.

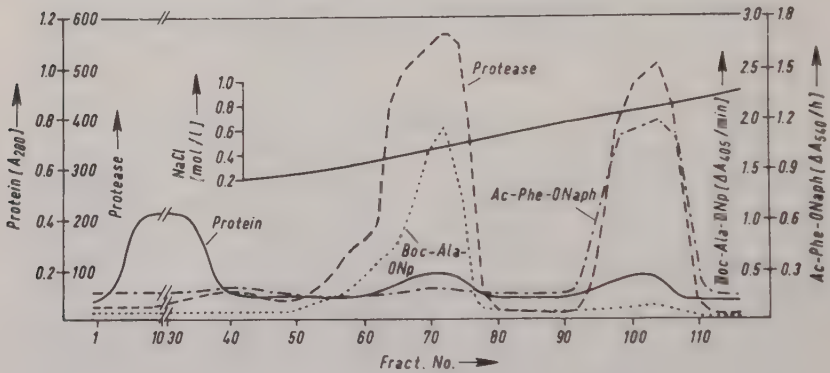


Abb. 4: Ionenaustauschchromatographie der aktiven Sephadex G 100 Fraktion (Fr.59 - 82) an CM-Sephadex C 50. Säule: 1,5 x 30 cm; Fraktionsvolumen: 1,4 ml. Die Säule war mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit 0,2 M NaCl äquilibriumiert. Die Elution wurde mit 150 ml eines Kochsalzgradienten von 0,2 - 1,0 M durchgeführt. In den Fraktionen wurde die Absorption bei 280 nm und die Enzymaktivitäten, wie in Abb.3 angegeben, gemessen.

3. 2. 3 Ausbeuten und Reinheit

Die Ausbeuten und die Anreicherung der beiden Enzymfraktionen während der einzelnen Reinigungsschritte sind in Tab. 2 und 3 zusammengestellt. ELP wurde etwa 50-fach aus dem Granulaextrakt angereichert und mit einer Ausbeute von über 80 % isoliert. Bei CLP trat bei der Ionenaustauschchromatographie ein großer Aktivitätsverlust auf, der wahrscheinlich durch Verluste bei der Dialyse und durch Aggregation bei der niedrigen Ionenstärke bedingt ist.

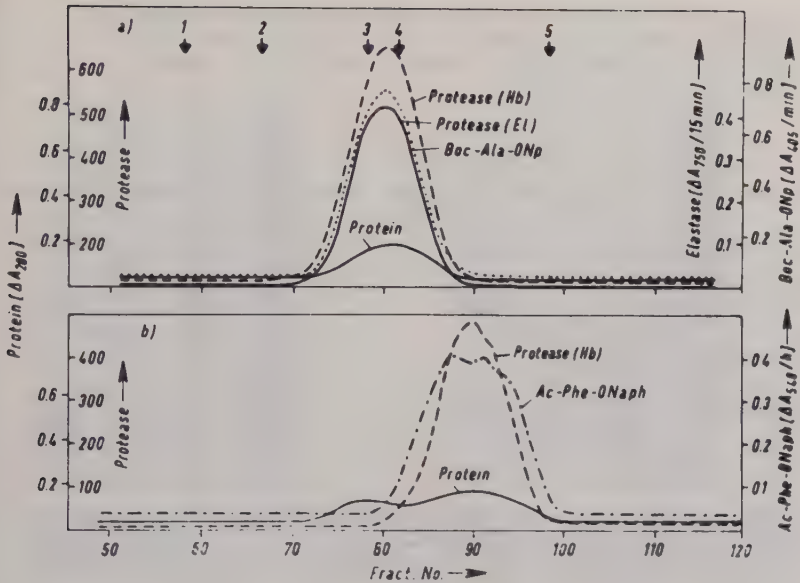


Abb. 5: Sephadex G 75 Chromatographie von konzentrierter (5ml) elastaseähnlicher (a) und chymotrypsinähnlicher Esterase (b) der CM-Sephadex-Auftrennung. Säule: 2,5 x 90 cm; Fraktionsvolumen: 3,5 ml; Puffer: 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl. In den Fraktionen wurde die Absorption bei 280 nm (—), die Proteaseaktivität gegen F-Hb-denat (- - -) und Elastin (— · —) und Esteraseaktivität mit einem Elastase- (...) und Chymotrypsinsubstrat (-.-.-) gemessen. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die Säule mit Rinderserumalbumin, 68000 (1), Ovalbumin, 45000 (2), Rindercarboanhydrase, 30000 (3), Chymotrypsinogen, 25000 (4) und Cytochrom C, 11000 (5) geeicht.

Berücksichtigt man, daß die Granulafraktion 30 % des Eiweißes und 80 % der Proteaseaktivität des Homogenats der Granulozyten enthielt und, daß der Extrakt daraus 38 % des Proteins und 94 % der Proteaseaktivität der Granula enthielt, so errechnet sich für BOC-Ala-ONp-Esterase eine 345-fache Anreicherung und für die Ac-Phe-ONaph-Esterase eine 165-fache Anreicherung bezogen auf das Zellhomogenat.

Tab. 2: Reinigung der elastaseähnlichen Protease aus menschlichen Granulozyten. Die relative spezifische Aktivität wurde aus der Esteraseaktivität gegen BOC-Ala-ONp ermittelt.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Spez. Akt. (U/mg)	Gesamt-Akt. (U)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Granula-Extrakt (entspr. 10^{10} Zellen)	52,0	10	520	100	(1)
Sephadex G 100- Chromatographie	6,8	76	510	98	7,6
CM-Sephadex- Chromatographie	0,8	509	423	81	51,0

Tab. 3: Reinigung der chymotrypsinähnlichen Protease aus menschlichen Granulozyten. Die relative spezifische Aktivität wurde aus der Esteraseaktivität gegen Ac-Phe-ONaph ermittelt.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Spez. Akt. (U/mg)	Gesamt-Akt. (U)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Granula-Extrakt (entspr. 10^{10} Zellen)	52,0	60	3120	100	(1)
Sephadex G 100 - Chromatographie	6,8	431	2933	94	7,2
CM-Sephadex - Chromatographie	1,8	991	1584	51	16,6
Sephadex G 75 - Chromatographie	1,1	1388	1489	48	24,4

Die elektrophoretische Auftrennung der beiden Proteasen nach Sephadex G 75 Chromatographie ist in Abb. 6 wiedergegeben. Die elastaseähnliche Leukozytenprotease besteht aus 3 Hauptproteinen, die alle Fibrinogen abbauen und

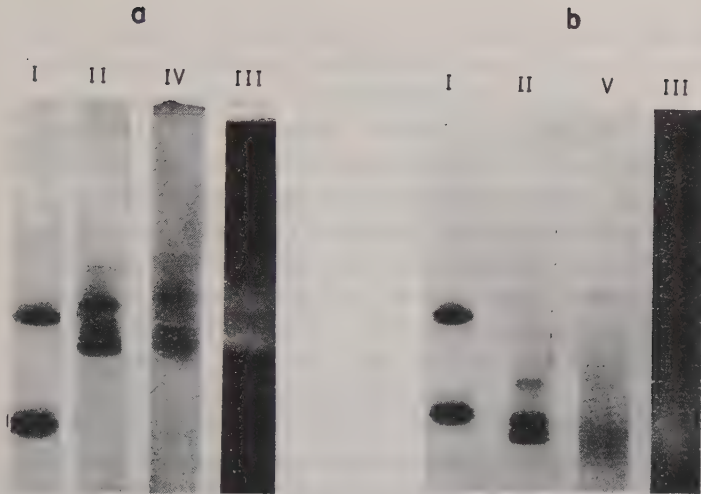


Abb. 6: Polyacrylamidelektrophorese von (a) elastaseähnlicher Protease und (b) chymotrypsinähnlicher Protease nach Sephadex G 75 Chromatographie bei pH 4,5 nach REISFELD (77)
I : Markerproteine: Chymotrypsinogen (C) und Lysozym(L).
II : Proteinfärbung mit Coomassie Blue G 250.
III: Lysiszonen im Fibrinogengel (1,5mg Fibr./ml Gel).
IV : Esterasefärbung für ELP mit Ac-Ala-ONaph.
V : Esterasefärbung für CLP mit Ac-Phe-ONaph.

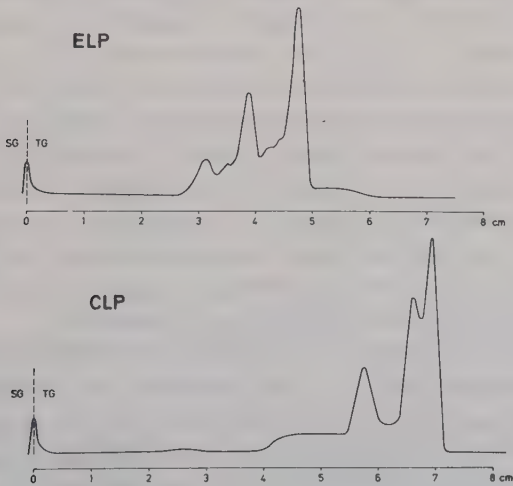


Abb. 7: Densitogramme der Proteinfärbungen aus Abb. 6 von ELP und CLP.

Esteraseaktivität gegenüber Ac-Ala-ONaph zeigen. Es sind jedoch drei zusätzliche Nebenbanden sichtbar: zwei nach der am schnellsten wandernden Protease und eine zwischen den beiden langsamer wandernden Enzymen. Alle diese Nebenbanden zeigen ebenfalls Proteaseaktivität im Fibrinogengel. Die chymotrypsinähnliche Leukozytenprotease besteht aus drei stark kationischen Proteinen, die alle Proteaseaktivität gegen Fibrinogen und Esteraseaktivität gegen Ac-Phe-ONaph zeigen. Die densitometrische Auswertung der Proteinfärbung (Abb. 7) ergab eine Reinheit von 96 % für die ELP und von 89 % für CLP. Da die Verunreinigung der CLP in Abhängigkeit von den Elektrophoresebedingungen unterschiedlich stark auftritt, handelt es sich wahrscheinlich um denaturiertes Enzym. Diese Denaturierung tritt bei höherem pH nicht mehr auf (vergl. Abb. 12 a, b).

3. 2. 4 Alternative Reinigungsverfahren

Die Leukozytenproteasen werden sehr fest an poröses Glas (CPG-10, 350 Å) gebunden (siehe 3.3.1f). Die unterschiedliche Ablösbarkeit von ELP und CLP durch Äthylenglycolmonomethyläther erlaubte bei Gradientenelution an einer Säule die Auftrennung der beiden Enzyme (Abb. 8).

Die Eigenschaft der Leukozytenproteasen D-Tryptophanmethylester zu binden, kann zu ihrer raschen Isolierung verwendet werden. Aus Granulaextrakten oder Gesamtzellsaten von Granulozyten wurden in Gegenwart von 1 M NaCl ELP und CLP mit nur geringen Verunreinigungen an Agarose- ϵ -Aminocapryl-D-Tryptophanmethylester absorbiert, von denen Myeloperoxidase den Hauptteil ausmacht.

Mit 0,3 M Acetatpuffer pH 3,0 wurden die Enzyme von der Säule desorbiert (Abb. 9). Die Ausbeute der Proteaseaktivität betrug 94 %. Zu bemerken ist, daß die Absorption der Proteasen aus Gesamtlysate an diese Säule ohne NaCl-Zusatz nur unvollständig verläuft, offensichtlich durch Komplexbildung mit dem von JANOFF beschriebenen Inhibitor aus dem Cytoplasma (99).

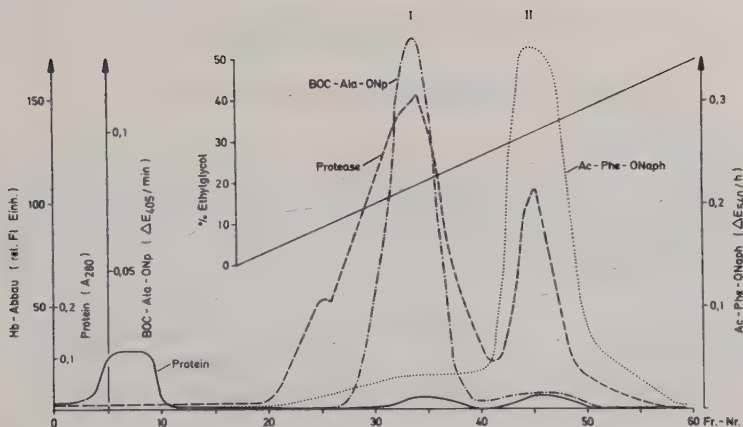


Abb. 8: Auftrennung der Granulozytenproteasen an porösem Glas (CPG-10, 350 Å), Säule: 0,5 x 24 cm; Fraktionsvolumen: 1,6 ml; Puffer 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5; Probe: 9,0 ml der Proteasefraktion nach Sephadex G 100 Chromatographie (400 µg Protein). Die Auftrennung erfolgte durch einen Ethylglycolgradienten von 0 - 50 %. In den Fraktionen wurde die Extinktion bei 280 nm (—), Proteaseaktivität gegen F-Hb-denat (- - -) und Esteraseaktivität gegen BOC-Ala-ONp (-.-.-) und Ac-Phe-ONaph (...) gemessen.

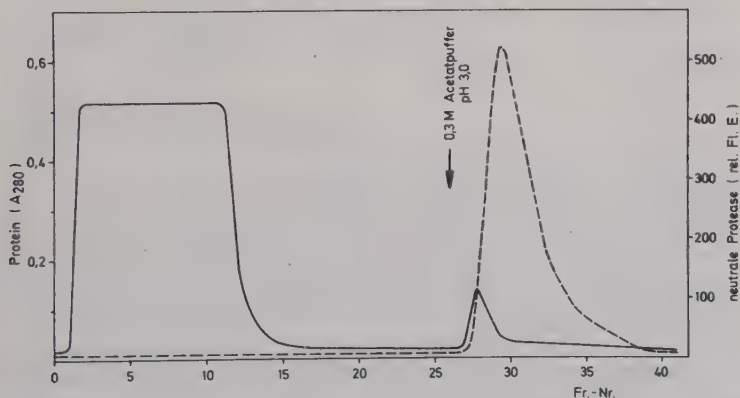


Abb. 9: Chromatographie an Agarose-ε-Aminocapryl-D-Tryptophanmethylester. Säule: 0,9 x 20 cm; Fraktionsvolumen: 4,8 ml; Puffer: 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl; Probe: Gesamtextrakt aus 10^9 Granulozyten. Zur Desorption der Proteasen wurde (Pfeil) mit 0,3 M Acetatpuffer, pH 3,0 eluiert. Die Absorption bei 280 nm (—) und die Proteaseaktivität gegen F-Hb-denat (---) wurde in den Fraktionen gemessen.

3. 3 EIGENSCHAFTEN DER LEUKOZYTENPROTEASEN

3. 3. 1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

a) UV-Spektren

Die gereinigten Leukozytenproteasen ELP und CLP zeigten ein typisches Proteinspektrum mit einem Maximum bei 280 nm und einem Minimum bei 251 nm. Das Absorptionsverhalten ist in der Tabelle dargestellt.

	ELP	CLP
A 280 / 260	1,49	1,56
A 280, 1 %, 1 cm	32,0	18,8

Ein Kohlehydratanteil ließ sich mit der Orcin-Methode (95) nicht nachweisen.

b) Molekulargewicht

Die Chromatographie an Sephadex G 75 ergab, in Abhängigkeit von der Ionenstärke, für die Leukozytenproteasen folgende scheinbaren Molekulargewichte:

	ELP	CLP
0,05 M Trispuffer, pH 7,5	18 000	12 500
" " " + 0,5 M NaCl	27 000	14 000
" " " + 1,0 M NaCl	27 000	18 000

Die Säule wurde bei jeder Ionenstärke jeweils neu mit Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Rindercarboanhydrase, Chymotrypsinogen und Cytochrom C geeicht (vergl. 3.2.2c) und der Logarithmus des Molekulargewichts gegen das Elutionsvolumen aufgetragen.

Die SDS-Elektrophorese in Polyacrylamidgel (siehe 2.4.5c) ergab ein Molekulargewicht von 27 000 - 31 000 Dalton für ELP und von 18 000 - 22 000 Dalton für CLP (Abb. 10).

c) Elektrophoretisches Verhalten

Die elektrophoretische Beweglichkeit der beiden Enzyme ist aus Abb. 6 ersichtlich. Lysozym und Chymotrypsinogen dienen als Bezugsenzyme. Die Wanderungsgeschwindigkeit

der ELP entspricht etwa der des Chymotrypsinogens, die der CLP derjenigen des Lysozyms.

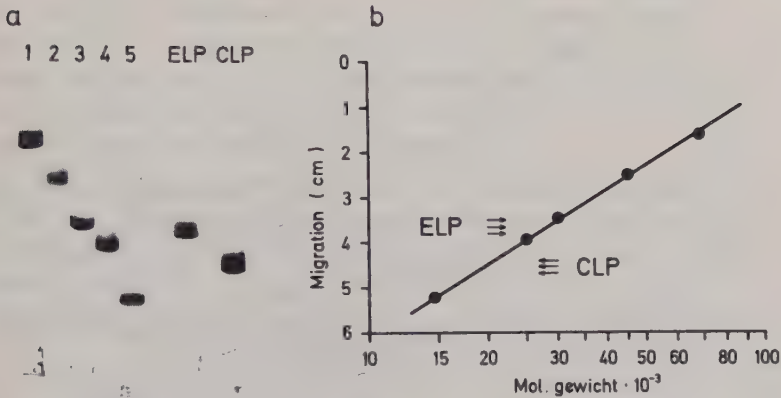


Abb. 10: Bestimmung des Molekulargewichts von ELP und CLP durch SDS-Elektrophorese in 15 %igem Polyacrylamidgel (siehe 2.4.5c). Bezugsproteine: Rinderserumalbumin (1), Ovalbumin(2), Rindercarboanhydrase (3), Chymotrypsinogen (4), Lysozym (5).

a) Proteinanfärbung des Gels

b) Graphische Auswertung der Trennung. Die relative elektrophoretische Beweglichkeit ist gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen.

d) Isoelektrischer Punkt

Die isoelektrische Focussierung in Polyacrylamidgel ergab für die ELP einen isoelektrischen Punkt von 10,1 (Abb. 11a). Der isoelektrische Punkt von CLP konnte mit dieser Methode nicht bestimmt werden, da er außerhalb des pH-Bereiches der verfügbaren Ampholinlösungen liegt. Durch Celluloseacetatelektrophorese mit einer Pufferreihe der Ionenstärke 0,1 und graphische Extrapolation der Wanderstrecke (Abb. 11b) wurde ein isoelektrischer Punkt von 10,2 für ELP und von 11,4 für CLP ermittelt.

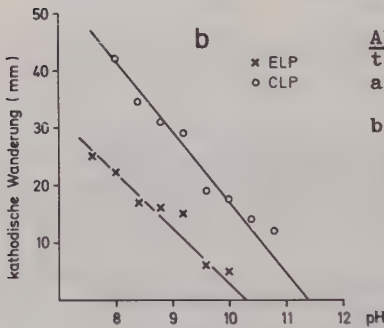
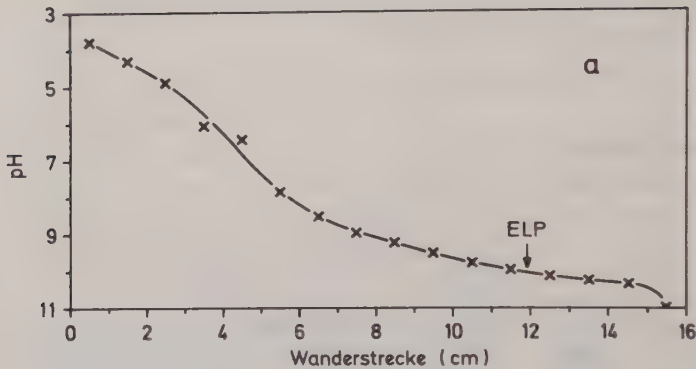


Abb. 11: Bestimmung des isoelektrischen Punktes

- a) Isoelektrische Focussierung von ELP (siehe 2.4.5d),
b) graphische Darstellung der Wanderstrecken von ELP (x) u. CLP (o) in der Celluloseacetatelektrophorese mit Puffern (pH auf der Abszisse) der Ionenstärke 0,1.

e) Polymorphismus

Auf den auffälligen Polymorphismus der Enzyme wurde bereits unter 3.2.3 hingewiesen. Gegen elektrophoretische Artefakte als Ursache des Polymorphismus sprechen folgende Beobachtungen:

1. Die Aufspaltung in Einzelbanden erfolgt auch in anderen Puffersystemen (Cacodylsäurepuffer, pH 6,5; Acetatpuffer, pH 5,5) (Abb. 12 a, b).
2. Die einzelnen aus dem Gel extrahierten Banden spalten bei der Reelektrophorese nicht weiter auf.
3. Für die CLP können Unterschiede im Molekulargewicht der Einzelbanden durch Sephadex G 75-Auftrennung gezeigt werden (Abb. 12 c).

Um partielle Proteolyse im Verlauf der Reinigung der Enzyme auszuschließen, wurde die Granulaextraktion und nachfolgende kontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese mit Acetatpuffer bei pH 4,0 vorgenommen. Bei diesem pH ist keine Protease aktivität in den Granulozyten nachweisbar. Die anschließende Inkubation der Fibrinogengele bei pH 7,5 zeigte die für ELP und CLP aus Abb. 6 bekannten Lysishöfe (Abb. 12 d).

Die densitometrische Auswertung der Proteinfärbungen (Abb. 7) ergab für die Hauptproteinbanden der ELP in der Reihe zunehmender elektrophoretischer Beweglichkeit ein Verhältnis 1:3:5. Für die CLP ergab sich bei analoger Auswertung der Proteinfärbung ein Verhältnis von 3:4:4.

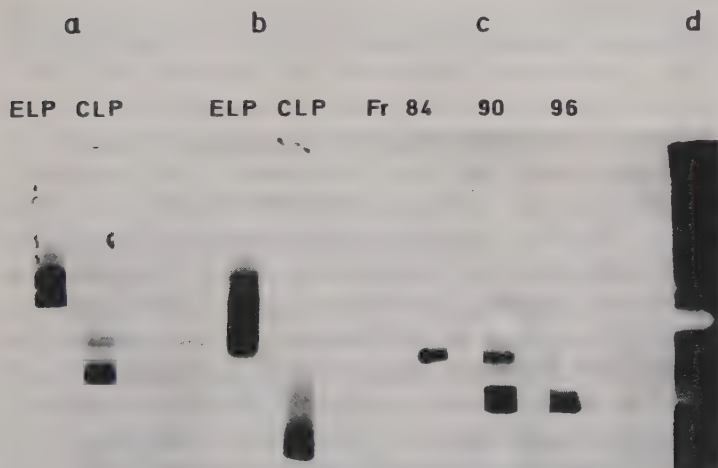


Abb. 12: Polyacrylamidgelelektrophoresen von
a) ELP und CLP in Cacodylsäurepuffer pH 6,5 (76),
b) ELP und CLP im 0,025 M Acetatpuffer pH 5,5
(Elektrodenpuffer: 0,1 M Acetatpuffer pH 5,5),
c) Fr 84 des ansteigenden Schenkels, Fr 90 des Maximums
und Fr 96 des abfallenden Schenkels der Sephadex G 75-
Chromatographie von CLP nach REISFELD (77) (siehe 2.4.5b),
d) pH 4,0-Extrakt aus Granula (15) im kontinuierlichen
Gelsystem bei pH 4,0, Acetatpuffer. Gelpuffer: 0,025 M,
Elektrodenpuffer: 0,1 M.

f) Adsorptionsverhalten

Das scheinbar verringerte Molekulargewicht der Leukozytenproteasen bei Chromatographie an Sephadex G 75 bei niedriger Ionenstärke beruht wahrscheinlich auf der Wechselwirkung mit der Gelmatrix.

Aufgrund ihres basischen isoelektrischen Punktes werden die Leukozytenproteasen besonders von negativ geladenen Gruppen an Oberflächen gebunden. Auch Cellulose bindet noch in Gegenwart von 1 M NaCl etwa 10 μ g Protease pro Gramm Cellulose. Noch größer ist die Kapazität von porösem Glas (CPG-10, 350 Å), das etwa 100 μ g/g Glas bindet. Die Proteasen können hiervon auch mit 2 M NaCl-Lösungen nicht eluiert werden. Erst Zugabe von Äthylenglycolmonomethylester führte zu ihrer Desorption (siehe auch 3.2.4).

3. 3. 2 Stabilität

Die gereinigten Leukozytenproteasen sind relativ stabile Enzyme. Bei dreimaligem Einfrieren und Auftauen geht 5 % der Aktivität verloren. Eine Woche Aufbewahrung bei 4° C führt zu keinem wesentlichen Aktivitätsverlust. Erhitzen auf 56° C für 30 min. läßt die Proteaseaktivität unbeeinflusst, jedoch wird bei 65° C die Aktivität in 10 min. zum größten Teil zerstört (Abb. 13). Werden die Proteasen für 24 Std. bei verschiedenen pH-Werten in den entsprechenden 0,2 M Puffern inkubiert, so wurde die größte Stabilität der ELP in pH-Bereich 6 - 8 beobachtet, während CLP im pH-Bereich 4 - 7 am stabilsten war. Eine gegenseitige Proteolyse der gereinigten Enzyme wurde nicht beobachtet. Bei gemeinsamer Inkubation für 24 Std. ist kein Abfall der esterolytischen Aktivität gegen BOC-Ala-ONp oder Ac-Phe-ONaph feststellbar.

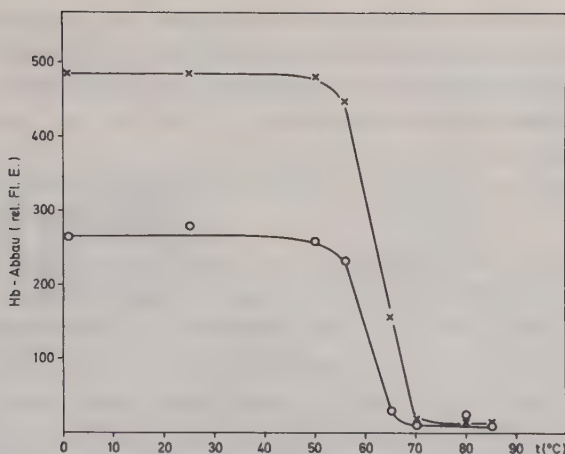


Abb. 13: Temperaturstabilität von ELP (x) und CLP (o). Die Enzyme wurden 10 min. bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und danach die proteolytische Aktivität gegen F-Hb-denat bei 30° C gemessen.

3. 3. 3 Enzymatische Aktivität

3. 3. 3. 1 Proteinsubstrate

a) pH- und Ionenstärkeabhängigkeit

Die pH-Abhängigkeit der Protease-Aktivität wurde mit denaturiertem Hämoglobin als Substrat gemessen. Die Leukozytenproteasen zeigen Aktivität über einen sehr weiten pH-Bereich (Abb. 14). Das pH-Optimum lag für ELP bei 8,0 und für CLP bei 7,5. Bei pH 11,0 waren noch 50 % der Maximalaktivität der ELP vorhanden; bei pH 11,5 deutete sich ein Nebenmaximum an, das ab pH 12,5 steil abfiel. Die Inkubation der im Fibrinogengel aufgetrennten ELP bei pH 11,5 zeigte Aktivität für alle drei Hauptproteine des Enzyms.

Die Geschwindigkeit der Proteolyse von denaturiertem Hämoglobin durch beide Proteasen zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Ionenstärke, die durch Zusatz von NaCl eingestellt wurde, mit einem Maximum bei 0,2 M NaCl für CLP und 0,3 M NaCl für ELP (Abb. 15).

Die Abhängigkeit der Hämoglobinverdauung von der Temperatur ist in Abb. 16 wiedergegeben. Der bei 65° C erfolgende Aktivitätsabfall ist im Einklang mit den Befunden der Temperaturstabilität (3.3.2).

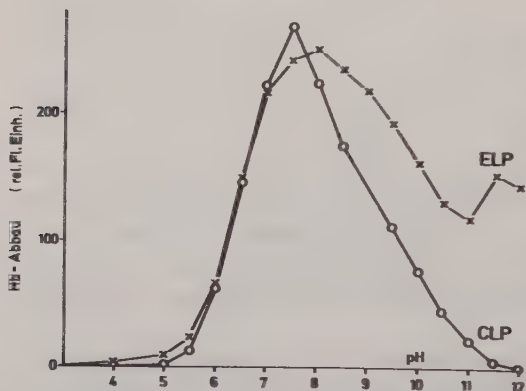


Abb. 14: Einfluß des pH auf die proteolytische Aktivität von ELP (x) und CLP (o) gegen F-Hb-denat (vergl. 2.4.2).

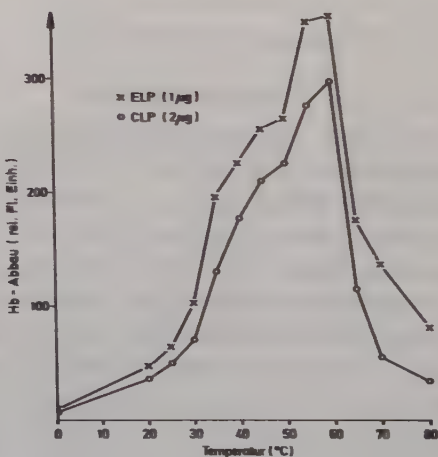
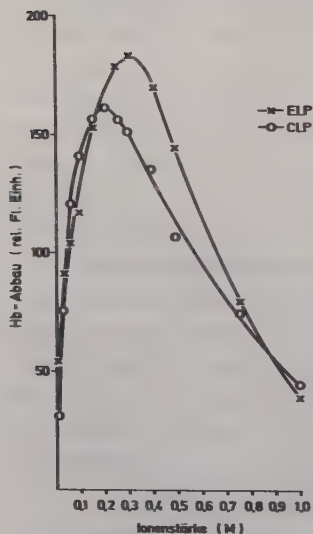


Abb. 15: Einfluß der Ionenstärke auf die Geschwindigkeit des F-Hb-denat-Abbaus durch ELP (x) und CLP (o). Die Ionenstärke wurde durch Zusatz von NaCl eingestellt. Puffer: 0,05 Trispuffer, pH 7,5.

Abb. 16: Abhängigkeit der Geschwindigkeit der F-Hb-denat-Abbaus durch ELP (x) und CLP (o) von der Temperatur. Der Verdauungszusatz wurde 30 min. bei der angegebenen Temp. inkubiert und nach Abstoppen mit Trichloressigsäure wie unter 2.4.2 weiterbehandelt.

b) Kinetik

Die Zeitabhängigkeit des Abbaus von nativem Fibrinogen und denaturiertem Hämoglobin durch die Leukozytenproteasen ist in Abb. 17 wiedergegeben. Mit $1,0 \mu\text{g}$ Enzym verlaufen die Kurven linear bis 15 min. ELP spaltet das native Substrat viermal, das denaturierte dreimal so schnell wie CLP.

Die Abhängigkeit der Proteolysegeschwindigkeit von denaturiertem Hämoglobin, von nativem Fibrinogen, Casein und Albumin von der Konzentration der Leukozytenproteasen ist in Abb. 18 wiedergegeben.

Denaturiertes Hämoglobin wird von beiden Enzymen am besten verdaut, während die beiden Proteine mit relativ saurem isoelektrischem Punkt, Casein und Albumin am wenigsten gespalten werden. In Abb. 19 ist die Enzymabhängigkeit der Elastinspaltung dargestellt. Nur die elastaseähnliche Protease spaltet dieses Substrat.

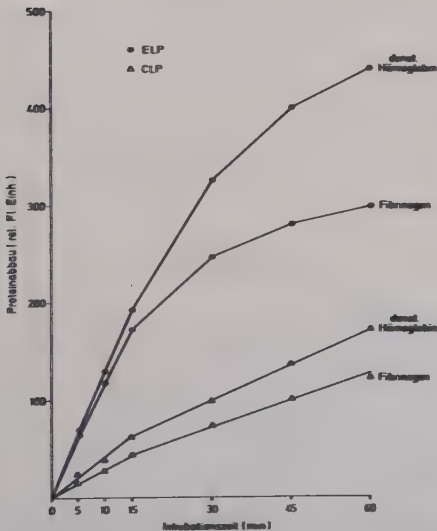


Abb.17: Zeitabhängigkeit des Abbaus von F-Hb-denat und F-Fibrinogen durch $1 \mu\text{g}$ ELP (.) und $1 \mu\text{g}$ CLP (Δ).

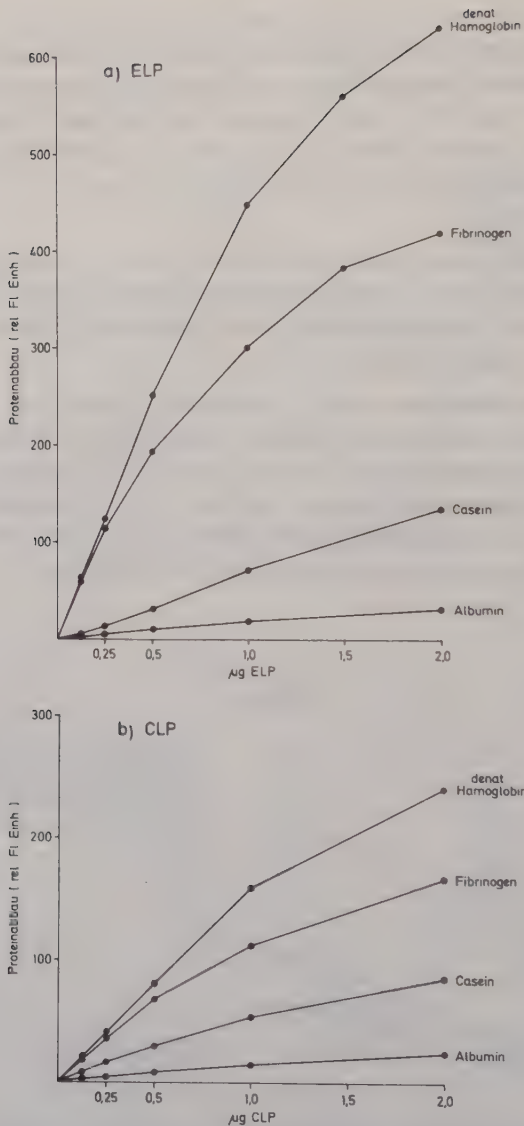


Abb. 18: Einfluß der Konzentration von ELP (a) und CLP (b) auf die Geschwindigkeit des Abbaus von denat. Hämoglobin, nativem Fibrinogen, Casein und Albumin (alle Substrate: FITC-markiert). Reaktionsansatz 0,5 ml; Puffer: 0,05 Tris-HCl, pH 7,5 + 0,25 M NaCl (siehe 2.4.2).

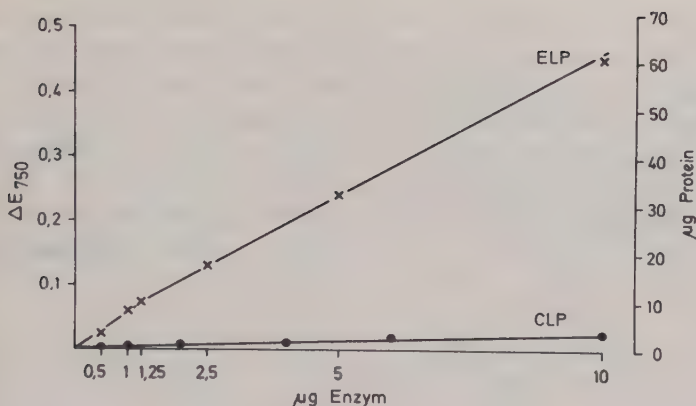


Abb. 19: Einfluß steigender Mengen an ELP (x) und CLP (•) auf die Geschwindigkeit der Elastinspaltung. 10 mg Elastin wurden in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml (0,05 M Tris-Puffer, pH 7,5, 0,25 NaCl) mit Enzym für 2 Std. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Abstoppen mit 1,0 ml 0,3 M Phosphatpuffer, pH 6,0 wurde im Überstand Protein nach LOWRY gemessen.

Die Abb. 20 zeigt die Abhängigkeit der Proteolysegeschwindigkeit von denaturiertem Hämoglobin, von nativem Fibrinogen, Casein und Albumin von der Substratkonzentration. Es fällt auf, daß bei Casein bereits bei einer sehr niedrigen Substratkonzentration eine Sättigung eintritt und eine Erhöhung der Konzentration, besonders bei CLP zu einer Hemmung führt.

3. 3. 3. 2 Estersubstrate

Bei der Reinigung der Proteasen zeigte sich bereits, daß BOC-Ala-ONp ein Substrat der ELP und Ac-Phe-ONaph ein Substrat der CLP ist. Das pH-Optimum für die Estersubstrate ist bei ELP nach pH 9,0 verschoben, während es bei CLP mit pH 7,5 dem für die Hämoglobinspaltung gleicht (Abb. 21). Die Esterolyse zeigte keine Abhängigkeit von der Ionenstärke im Bereich von 0,05 - 0,5 M.

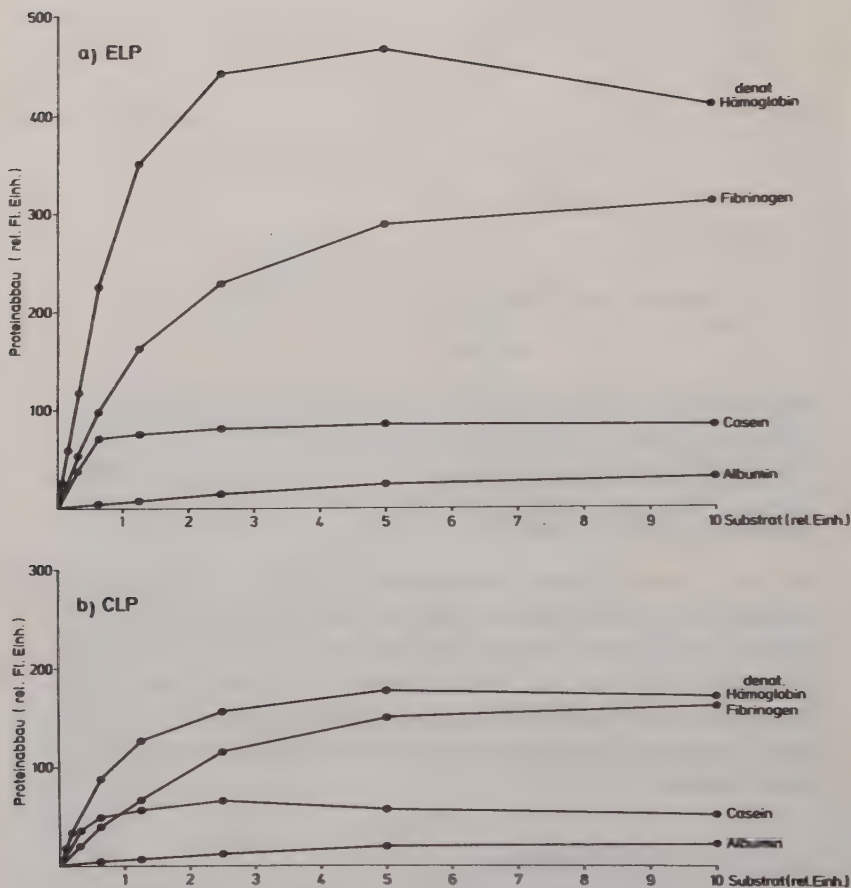


Abb. 20: Abhängigkeit der Proteolysegeschwindigkeit von denat. Hämoglobin, von nativem Fibrinogen, Casein und Albumin durch ELP (a) und CLP (b) von der Substratkonzentration. 1 rel. Einheit des Substrates entspricht: 170 μ g denat. Hämoglobin, 95 μ g Fibrinogen (nativ), 75 μ g Albumin und 65 μ g Casein. Alle Substrate waren FITC-markiert. Reaktionsvolumen: 0,5 ml; Puffer: 0,05 Tris-HCl, pH 7,5 + 0,25 M NaCl (siehe 2.4.2).

Zur Abgrenzung der Spezifität der Enzyme wurde eine Reihe weiterer Ester- und Amidsubstrate untersucht (Tab. 4). ELP spaltet ganz überwiegend Alanin-Ester und zu einem geringen Teil auch Ester anderer aliphatischer Aminosäuren. Sie ist somit in ihrer Spezifität der Pankreas-Elastase vergleichbar. CLP spaltet vorwiegend Ester aromatischer Aminosäuren und ist daher mit Chymotrypsin vergleichbar.

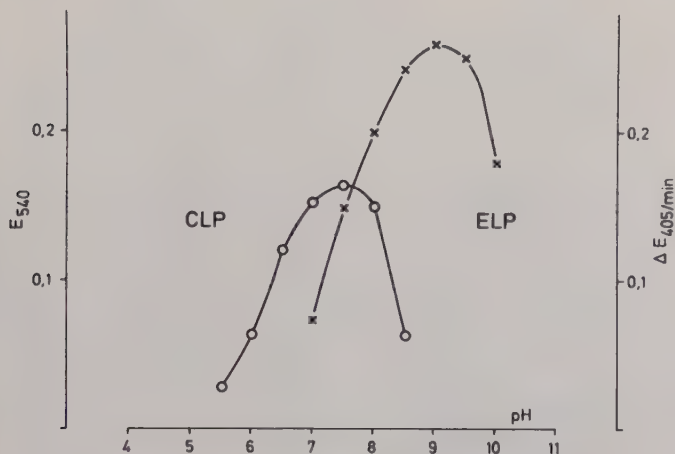


Abb. 21: Einfluß des pH auf die Esteraseaktivität von ELP gegenüber BOC-Ala-ONp (x) und von CLP gegenüber Ac-Phe-ONaph (o). (vergl. dazu 2.4.3).

Kinetik

Die Esterolysen von BOC-Ala-ONp durch ELP und von BOC-Phe-ONp durch CLP (Abb. 22) zeigen eine lineare Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Die Ac-Phe-ONaph-Spaltung durch CLP wurde einerseits nach der Methode von KAMINSKY (96), andererseits durch Kuppeln mit einem Azofarbstoff gemessen (siehe 2.4.3). Beide Methoden sind sehr empfindlich zum Nachweis der CLP, aber wegen der schlechten Löslichkeit des Substrates zur Ermittlung echter Anfangsgeschwindigkeiten nicht geeignet.

Tab. 4: Relative spezifische Aktivitäten von ELP und CLP gegenüber einigen N-substituierten Aminosäure-p-Nitrophenylestern und Aminosäure-p-Nitroaniliden. Substratkonzentration: 0,04 mM; Reaktionsvolumen: 2,0 ml; Temperatur: 25°C. Die Geschwindigkeit der p-Nitrophenol/p-Nitroanilidfreisetzung wurde bei 405 nm gemessen.

Substrat	E ₄₀₅ /min. x µg. Enzym	
	ELP	CLP
BOC - Gly - ONp	0,005	0,006
BOC - Ala - ONp	0,071	0,005
Z - Ala - ONp	0,134	0,007
BOC - Ile - ONp	0,027	0,010
Ac - Phe - ONp	< 0,001	0,129
BOC - Phe - ONp	0,011	0,500
Z - Phe - ONp	0,040	0,276
BOC - Tyr - ONp	0,010	0,483
BOC - Gln - ONp	< 0,001	< 0,001
Ac - ONp	< 0,001	< 0,001
Ac - Ala - NNp	< 0,001	-
BOC - Ala - Ala - NNp	< 0,001	-
Ac - Tyr - NNp	-	< 0,001
Gly - Phe - NNp	-	< 0,001
Glu - Phe - NNp	-	< 0,001
B - Arg - NNp	0	0

Die kinetischen Konstanten der beiden Leukozytenproteasen wurden für eine Reihe von N-substituierten p-Nitrophenylester bestimmt. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden graphisch ermittelt und in LINEWEAVER-BURK-Diagrammen ausgewertet (Abb. 23).

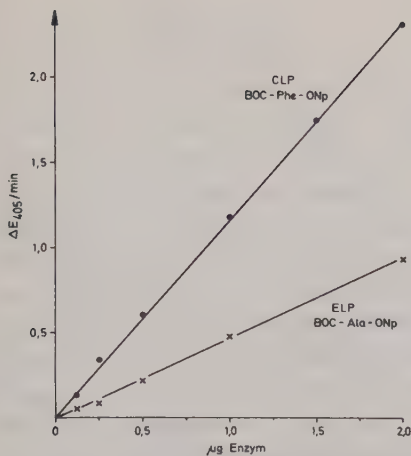


Abb. 22: Spaltung von BOC-Ala-ONp (0,4 mM) durch ELP (x) und von BOC-Phe-ONp (0,04 mM) durch CLP (.) in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Puffer: 0,05 Tris-HCl, pH 7,5, 5 % Aceton. Reaktionsvolumen: 2,0 ml, Inkubation bei 25°C.

In der folgenden Tabelle sind die Michaelis-Menten Parameter zusammengefaßt (Tab. 5).

Tab. 5: Michaeliskonstanten und katalytische Konstanten von Estersubstraten für ELP und CLP (vergl. Abb. 23).

Enzyme	Substrat	Puffer	K_M (M)	k cat ($\mu\text{mol/min.} \times \mu\text{g Enzym}$)
ELP	BOC-Ala ONp	1	$5,4 \cdot 10^{-4}$	0,114
ELP	Z -Ala ONp	1	$1,1 \cdot 10^{-4}$	0,122
CLP	Ac -Phe ONp	2	$6,3 \cdot 10^{-4}$	0,244
CLP	BOC-Phe ONp	2	$5,6 \cdot 10^{-4}$	1,429
CLP	Z -Phe ONp	2	$1,6 \cdot 10^{-4}$	0,103
CLP	BOC-Tyr ONp	2	$4,3 \cdot 10^{-4}$	0,930

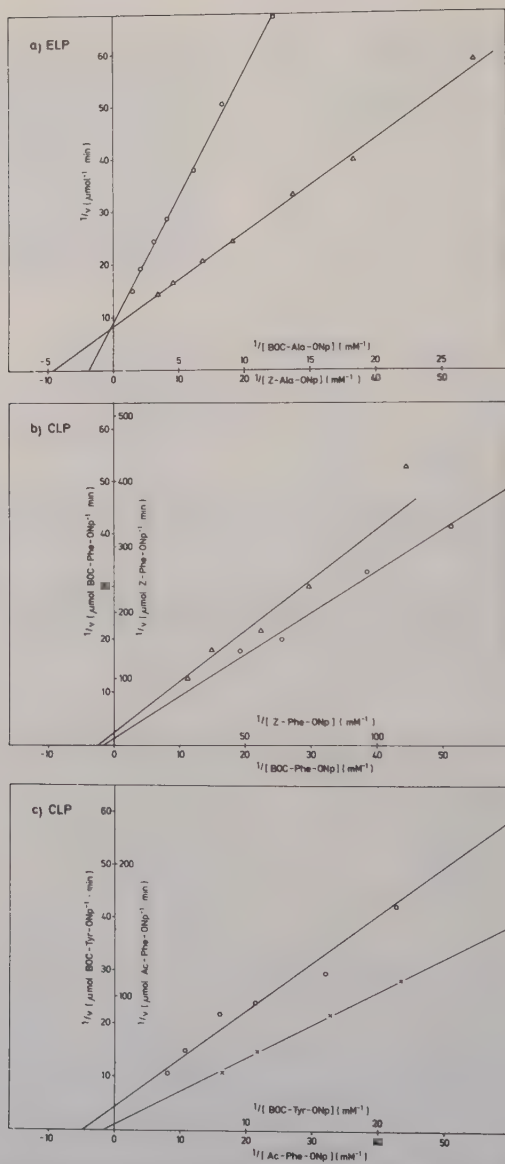


Abb. 23: Kinetik der Hydrolyse von BOC-Ala-ONp (o) (1) und Z-Ala-ONp (Δ) (2) durch ELP (a); von BOC-Phe-ONp (o) (3) und Z-Phe-ONp (Δ) (4) durch CLP (b) sowie von A-Phe-ONp (x) (5) und BOC-Tyr-ONp (o) (6) durch CLP (c).

3. 3. 3. 3 Effektoren

Der Einfluß von Metallionen und von Komplexbildnern auf die Proteaseaktivität von ELP und CLP wurde mit Hämoglobin als Substrat untersucht (Tab. 6). EDTA und NaF haben keinen Einfluß auf die Enzymaktivität. Ca^{2+} Ionen haben in hohen Konzentrationen einen aktivierenden Effekt auf die CLP, während Mg^{2+} Ionen in hohen Konzentrationen beide Proteasen zu etwa 50 % hemmen. Die Anwesenheit von 1 mM Cu^{2+} , Zn^{2+} und Hg^{2+} Ionen bewirkt ebenfalls eine Hemmung der Proteasen um 90, 80 bzw. 40 %. Gleichzeitige Gegenwart von 10 mM EDTA und 0,1 M Ca^{2+} führen überraschenderweise zu einer starken Hemmung der Proteaseaktivität.

Die Esteraseaktivität von ELP gegenüber BOC-Ala-ONp und von CLP gegenüber BOC-Phe-ONp wird durch EDTA und Ca^{2+} in gleicher Weise beeinflusst wie die Proteaseaktivität. Gleichzeitige Gegenwart von 10 mM EDTA und 0,1 M Ca^{2+} führen ebenfalls zu einer völligen Hemmung der Esteraseaktivität.

Tab. 6: Einfluß von Metallionen und Komplexbildnern auf die Proteaseaktivität von ELP und CLP gegenüber F-Hb-denat. Der Ansatz (Gesamtvol. 0,5 ml) enthielt 0,1 ml des Effektors in der angegebenen Verdünnung. Puffer: 0,05 Tris-HCl, pH 7,5 (siehe 2.4.2).

INHIBITOR 30 min. 30°C		% Rest-Aktivität					
		ELP (0,5 µg)			CLP (1,0 µg)		
Verdünnung		1:1	1:10	1:100	1:1	1:10	1:100
EDTA	0,02 M	104	107,9	104,7	112,5	92,8	83,9
NaF	0,1 M	95,3	105,0	102,5	99,5	90,2	101,8
MgCl_2	0,1 M	41,4	94,0	99,6	53,9	74,8	90,2
CaCl_2	0,1 M	95,7	114,0	103,9	131,7	120,3	103,6
CuSO_4	0,1 M	-	-	9,6	-	-	6,7
ZnSO_4	0,1 M	-	-	18,3	-	-	20,4
HgCl_2	0,1 M	-	-	64,1	-	14,4	56,5
CaCl_2	0,1 M+EDTA 0,01 M	18,5	-	-	10,0	-	-

Reaktionsvolumen: 2,0 ml; Puffer: 0,05 M Tris-HCl, pH-8,0 (a), 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 (b,c), mit 5 % Aceton; Temperatur: 25°C; Enzym: 1,0 µg für Substrat 1), 2) und 5), 0,5 µg für Substrat 3) und 4), 0,25 µg für Substrat 6).

3. 3. 4 Inhibitoren

a) Protein-Proteinaseinhibitoren

Die Hemmwirkung von Serum- und hochmolekularen Proteinaseinhibitoren wurde mit fluoreszein-markiertem Hämoglobin als Substrat gemessen. Menschliches Plasma enthält sehr wirksame Inhibitoren der Leukozytenproteasen (Abb.24). Ein μg beider Proteasen wird von 1 μl Plasma zu 50 % und von 3 μl Plasma nahezu völlig gehemmt. Die noch vorhandene Restaktivität der CLP nimmt bei weiterer Erhöhung der Plasmakonzentration nur langsam ab, ein Effekt, der auch für die CLP-Hemmung durch α_2 -Makroglobulin beobachtet wurde.

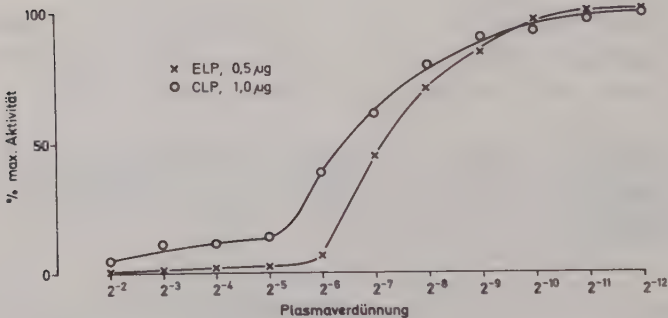


Abb. 24: Hemmung der Proteaseaktivität von ELP (x) und CLP (o) durch Plasma. 0,1 ml der Proteasen (0,5 μg ELP, 1,0 μg CLP) wurden mit 0,1 ml der entsprechenden Plasmaverdünnung für 30 min. bei 30°C inkubiert und in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml die Aktivität gegen F-Hb-denat. gemessen (siehe 2.4.2).

Der Versuch mit gereinigten Serum-inhibitoren zeigte, daß beide Proteasen von α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin gehemmt werden (Tab. 7). α_1 -Antichymotrypsin hemmt nur die CLP, während der C_1 -Esteraseinhibitor keine Hemmwirkung für ELP oder CLP zeigte.

Tab. 7: Einfluß gereinigter Proteaseinhibitoren aus menschlichem Serum auf die Proteaseaktivität von ELP und CLP gegen F-Hb-denat. Reaktionsansätze wie bei Abb. 24.

INHIBITOR 30 min., 30°C		% Restaktivität	
		ELP (0,5 µg)	CLP (1,0 µg)
α_1 AT	100 µg	0.5	4.4
α_2 M	200 µg	38.7	62.2
α_1 ACh	200 µg	100.1	3.2
C ₁ EI	200 µg	95.4	81.3

Wurde menschliches Plasma mit den Proteasen inkubiert und anschließend einer zweidimensionalen Immunelektrophorese unterworfen, so zeigte sich, daß die Proteasen an α_1 -Antitrypsin gebunden werden, das dann in charakteristischer Weise langsamer wandert (Abb. 25).

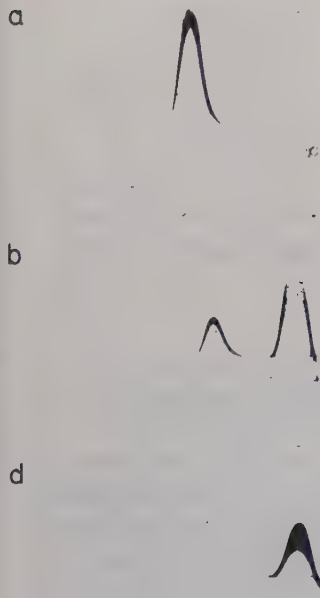


Abb. 25: Zweidimensionale Immunelektrophorese von 4 µl Normalplasma (human) a) ohne Zusatz; b) + d) nach Zugabe von 2 µg ELP und c) nach Zugabe von 2 µg CLP. Das Antiserum für die zweite Dimension war 0,03 ml Anti- α_1 -AT-Serum (a-c) und 0,2 ml Anti-ELP-Serum (d). Elektrophorese für 2 Std. bei 190 V (1. Dimension) und für 18 Std. bei 130 V (2. Dimension). Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250.

In dem Komplex ist ELP bei Verwendung des spezifischen Antiserums immunologisch noch nachweisbar (hierzu siehe auch 3.3.5) (Abb. 25 d). Die am Inhibitor gebundene CLP konnte jedoch durch das spezifische Antiserum nicht mehr präzipitiert werden.

Die polyvalenten Protein-Proteinaseinhibitoren aus Leguminosen (SBI und LBI) und Säugetiergewebe (KI, PI, Trasylol) erwiesen sich als potente Hemmstoffe der Leukozytenproteasen, wobei die CLP im allgemeinen stärker beeinflusst wurde (Tab. 8). Ovomuroid zeigte nur geringe Hemmwirkung.

Tab. 8: Hemmung der Proteaseaktivität von ELP und CLP durch polyvalente Proteinaseinhibitoren. Reaktionsansätze wie in Abb. 24.

INHIBITOR 30 min./30°C		% Restaktivität	
		ELP (0.5 µg)	CLP (1.0 µg)
SBI	1000 mIU	17.7	18.1
LBI	"	28.8	5.4
KI	"	59.2	27.4
PI	"	54.6	26.2
Trasylol	"	48.3	16.9
Ovomucoid	"	82.2	85.0

Für eine Reihe der Inhibitoren ist die Proteinmenge, die eine 50 %ige Hemmung der Proteasen bewirkt, in Tab. 9 zusammengestellt.

b) Niedermolekulare Inhibitoren

Eine Reihe der niedermolekularen Inhibitoren zeigte Quencheffekte auf die FITC-Fluoreszenz; daher wurde die Aktivität der Leukozytenprotease nach Einwirkung dieser Inhibitoren sowohl mit F-Hb-denat. als auch mit den Ester-substraten gemessen (Tab. 10). Beide Proteasen werden bereits durch sehr niedrige Konzentrationen von DFP und PMSF inaktiviert. Die Kinetik der Inaktivierung durch DFP ist in Abb. 26 wiedergegeben.

Tab. 9: I 50 %-Werte verschiedener Proteinase-Inhibitoren für ELP und CLP. Die Enzyme (1 μ g, 0,1 ml) wurden mit steigenden Mengen der Inhibitoren (0,1 ml) für 30 min. bei 30°C inkubiert. Die Aktivität gegen F-Hb-denat wurde in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml analog 2.4.2 gemessen und gegen die Inhibitorkonzentration (log. Skala) aufgetragen.

INHIBITOR 30 min., 30°C	I 50 %	
	ELP (1 μ g)	CLP (1 μ g)
α_1 AT	23,4 μ g	18,0 μ g
α_1 AC	-	115 μ g
α_2 M	800 μ g	600 μ g
SBI	220 mIU	80 mIU
LBI	450 mIU	3,5 mIU
KI	1800 mIU	250 mIU
Trasylol	1000 mIU	140 mIU

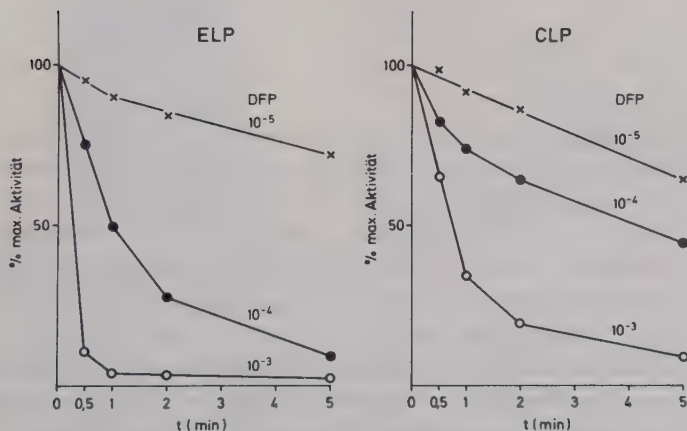


Abb. 26: Kinetik der Inaktivierung von ELP (1 μ g) und CLP (2 μ g) durch 10⁻³, 10⁻⁴ und 10⁻⁵ M DFP. Inkubationsansatz: 2,0 ml; Puffer: 0,05 Tris-HCl, pH 7,5, 5 % Isopropanol. Zu den angegebenen Zeiten wurde 0,1 ml Estersubstrat zugegeben (vergl. Tab. 10) und die p-Nitrophenolfreisetzung gemessen.

Tab. 10: Beeinflussung der Protease- und Esteraseaktivierung von ELP und CLP durch niedermolekulare Inhibitoren. 0,1 ml Enzym (0,5 μ g ELP; 1,0 μ g CLP) wurden mit 0,1 ml Inhibitor der angegebenen Konzentration für 30 ' bei 30°C inkubiert und die Aktivität gemessen. Aktivitätsmessung: a) Proteaseaktivität gegen F-Hb-denat als Substrat (vergl. Tab. 9); b) Esteraseaktivität gegen BOC-Ala-ONp (0,6 mM, ELP) oder BOC-Phe-ONp (0,05 mM, CLP) (vergl. 2.4.3).

INHIBITOR 30 min., 30°C			% Restaktivität	
			ELP 0.5 μ g	CLP 1.0 μ g
DFP	10 ⁻⁴	a b	0	0
PMSF	2 · 10 ⁻³	b	10	9
TLCK	2 · 10 ⁻³	b	100	91
TPCK	2 · 10 ⁻⁴	b	100	80
A Ala ₃ CK	10 ⁻³	b	43	100
IAA	10 ⁻⁴	b	88	96
pCMB	10 ⁻⁴	b	95	95.5
DTT	2 · 10 ⁻³	a	96	94
EAC	20 mg/ml	a	96.6	87.3

Die das aktive Zentrum angreifenden Inhibitoren für trypsinähnliche und chymotrypsinähnliche Proteasen, TLCK und TPCK haben keine Wirkung auf die ELP. Jedoch wird die CLP durch TPCK in einer sehr langsamen verlaufenden Reaktion partiell gehemmt. Nach 24 Std. Einwirkung sind noch 30 % der Aktivität vorhanden. Diese langsam verlaufende Hemmung spricht gegen einen Angriff am aktiven Zentrum und beruht wahrscheinlich auf einer unspezifischen Modifizierung anderer nukleophiler Gruppen des Enzyms. Der elastase-spezifische Inhibitor Ac-Ala₃CK reagiert nur mit ELP, jedoch wird erst bei höheren Konzentrationen eine ausreichend rasche Inaktivierung erreicht. Die SH-reaktiven Substanzen IAA, pCMB und DTT beeinflussen die Leukozytenenzyme nicht. Der Plasmininhibitor EAC hat ebenfalls keinen Effekt.

3. 3. 5 Immunologische Charakterisierung

Durch wiederholte intramuskuläre Injektionen von sehr kleinen Mengen der gereinigten Leukozytenenzyme ($10\text{ }\mu\text{g}$ ELP, $20\text{ }\mu\text{g}$ CLP) zusammen mit komplettem Freund'schen Adjuvans wurden in Kaninchen Antiseren gegen die beiden Proteasen erzeugt, die in der eindimensionalen Immundiffusion nach OCHTERLONY keine Kreuzreaktionen mit der jeweils anderen Protease zeigten (Abb. 27a). Die Antiseren erwiesen sich weiterhin insofern als spezifisch, als sie in der Immunelektrophorese keine Präzipitationssbögen mit anderen Granulaproteinen zeigten (Abb. 27 b). Dieser Befund ist auch als Reinheitskriterium der isolierten Proteasen zu werten. In einer Immundiffusion nach OCHTERLONY wurden die Proteaseantiseren gegen eine Reihe von Proteasen getestet.

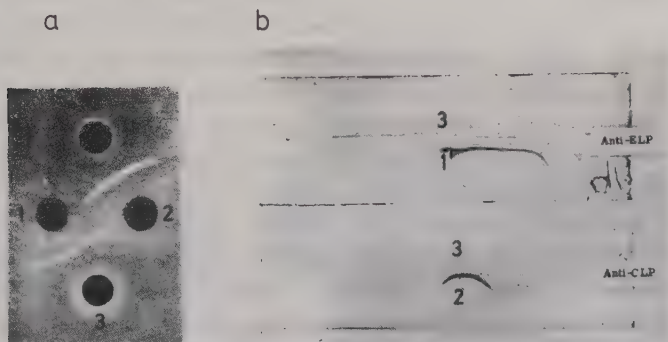


Abb. 27: Spezifität der Antiseren gegen die gereinigten Leukozytenproteasen aus Kaninchen.

a) Eindimensionale Immundiffusion nach OCHTERLONY.

1: ELP ($10\text{ }\mu\text{l}$, $20\text{ }\mu\text{g/ml}$), 2: CLP ($10\text{ }\mu\text{l}$, $40\text{ }\mu\text{g/ml}$),
3: Antiserum gegen ELP ($10\text{ }\mu\text{l}$), 4: Antiserum gegen CLP ($10\text{ }\mu\text{l}$).

b) Immunelektrophorese von ELP (1), CLP (2) und der hochmolekularen Fraktion des Granulaextraktes nach Sephadex G 100-Auftrennung (vergl. Abb. 3) (3) (jeweils $2\text{ }\mu\text{l}$). Diffusion gegen Anti-ELP-Serum (obere Rinne) und Anti-CLP-Serum (untere Rinne) (jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$). Anfärbung mit Coomassie Blue R 250.

In derselben Konzentration wie die Leukozytenproteasen (50 $\mu\text{g/ml}$), die unter diesen Bedingungen kräftige Präzipitationsbögen zeigten, war mit Plasmin (human), Thrombin (human), Trypsin (Rind), Chymotrypsinogen (Rind), Elastase (Schwein) und Urokinase (human) keine Präzipitation festzustellen.

Andererseits zeigten die Leukozytenproteasen keine Präzipitation mit Antiserum gegen menschliches Plasmin.

3. 4 FREISETZUNG DER PROTEASEN AUS GRANULOZYTEN IN VITRO

Zur Klärung der Frage unter welchen Bedingungen die neutralen Proteasen von Granulozyten freigesetzt werden, wurden die Zellen durch Dextransenkung und Ficollgradientenzentrifugation gereinigt und mit Antigen-Antikörper-Komplexen, Endotoxin, Polynucleotiden und Mitogenen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Es wurde parallel die Freisetzung von LDH, β -Glucuronidase und neutraler Protease bestimmt (Tab. 11). Während alle drei Enzyme eine geringe spontane Freisetzung in Gegenwart von Puffer oder Mitogen zeigten, wurden in Gegenwart von Antigen-Antikörperkomplexen nur β -Glucuronidase und die neutrale Protease vermehrt freigesetzt. Eine, wenn auch vergleichsweise viel schwächere Freisetzung der lysosomalen Enzyme war in einem bestimmten Konzentrationsbereich auch mit Endotoxin und Polynucleotiden nachzuweisen, während LDH praktisch unter keiner der genannten Bedingungen meßbar war. Die Bestimmung der Esteraseaktivität in den Überständen zeigte, daß nur ELP von den Granulozyten abgegeben wird, d.h. daß die mit dem Proteinsubstrat nachgewiesene neutrale Protease ausschließlich der ELP zuzuordnen ist.

In einem den Angaben von HENSON entsprechenden Versuchsansatz wurden Mikropor-Filter mit Antigen, Antikörper und Antigen-Antikörper-Komplexen mit und ohne Komplement beladen und anschließend Granulozyten daran angelagert (Methode vgl. 2.6b). Auch hier wurde die Freisetzung von LDH, β -Glucuronidase und neutraler Protease gemessen.

Tab. 11: Enzymfreisetzung aus Granulozyten 1×10^7) während 150 min. Kultur in Gegenwart von Antigen-Antikörper-Komplexen aus Tetanustoxoid und Antitoxin (AgAk), Endotoxin aus *Styphosa* (LpS), poly IC, Phythämagglutinin (PHA) und Concanavalin A (Con A). (Kulturansatz vergl. 2.6a).

Stimulans		Enzymfreisetzung (% max)				
		LDH	α -Glucuronidase	neutr. Protease	ELP	CLP
NaCL		3	4	7	4	2
AgAK	50 μ g	4	10	19	9	2
LpS	50 μ g	5	7	15	8	2
Poly IC	50 μ g	5	6	9	8	2
PHA	100 μ g	7	8	7	5	3
ConA	100 μ g	7	5	5	6	5

Die Abb. 28 zeigt, daß es auch unter diesen Bedingungen wieder zu einer aktiven Freisetzung der lysosomalen Enzyme kommt. Die stärkste Freisetzung war in Gegenwart von Antigen-Antikörper-Komplexen + Komplement nachzuweisen.

3. 5 EINFLUSS DER PROTEASEN AUF DAS BLUTGERINNUNGSSYSTEM

Der Einfluß der Leukozytenproteasen auf gereinigte Blutgerinnungsfaktoren ist in Tab. 12 dargestellt.

1,0 ml der Gerinnungsfaktoren wurden bei 37° C mit 0,1 ml Protease (2 μ g Protein) inkubiert und nach unterschiedlichen Zeiträumen in einem 0,1 ml Aliquot die Gerinnungsfaktoraktivität mit spezifischen Mangelseren bestimmt. Der Effekt der Proteasen auf Fibrinogen wurde mit fluoreszeinmarkiertem Fibrinogen als Substrat bestimmt (vergl. 3.3.3.1). Faktor XIII-Aktivität wurde mittels des Einbaus von 14 C-markiertem Putrescin in Casein gemessen (93).

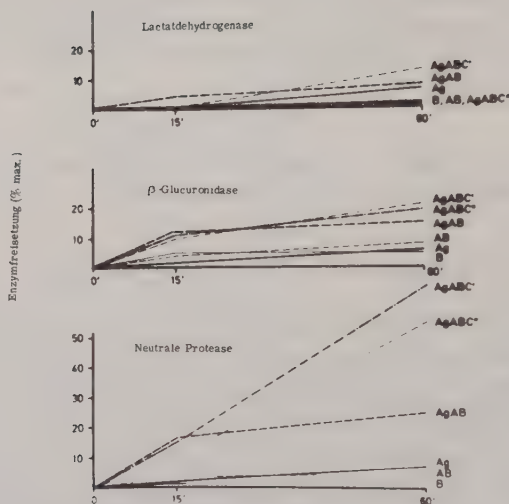


Abb. 28: Enzymabgabe durch Granulozyten (1×10^7) während der Adsorption an Milliporfiltern. Die Filter wurden mit NaCl (B), Tetanustoxoid (Ag), Tetanus Antitoxin (Ab), Antigen + Antikörper (AgAk), Antigen + Antikörper + Complement (AgAbC') oder Antigen + Antikörper + hitzeinaktiviertes Complement (AgAbC'') vorbehandelt. (Kulturansatz siehe 2.6b).

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß hauptsächlich die Gerinnungsfaktoren VIII und XII durch beide Enzyme abgebaut werden. Weiterhin zeigt die elastaseähnliche Protease eine hohe Aktivität gegen Fibrinogen, Faktor II, Faktor V und Faktor XIII. Faktor V wurde zunächst aktiviert und bei weiterer Inkubation abgebaut.

In weiteren Experimenten (Tab. 13) wurden 10 und 100 μg ELP mit 1,0 ml menschlichem Normalplasma gemischt und weitere 10 min. bei 37° C inkubiert. Dann wurde der Gehalt an Gerinnungsfaktoren bestimmt, wie in der Tab. 12 angegeben. Trotz der in großem Überschuß im Plasma vorhandenen Proteaseinhibitoren bewirkt ELP eine drastische Verminderung der Faktor VIII-Aktivität und eine mäßige Abnahme der Faktoren II, V und XII. Fibrinogen und Faktor XIII werden nicht signifikant verändert.

Tab. 12: Einfluß von ELP und CLP auf verschiedene gereinigte Gerinnungsfaktoren. Bestimmung der Faktoren siehe 2.9.a, c. x = 95 % Inaktivierung nach 120 min., ++ = 95 % Inaktivierung nach 60 min., +++ = 95 % Inaktivierung nach 20 min. Inkubation; x weist auf eine anfängliche Aktivierung hin.

Faktor	I	II	V	VII	VIII	XII	XIII
ELP	+++	+++	++ ^x	+	+++	+++	+++
CLP	+	+	+ ^x	++	+++	++	(+)

Tab. 13: Beeinflussung von Gerinnungsfaktoren im Plasma durch 10 min. Inkubation (37°C) mit ELP. In je 0,1 ml wurde die Aktivität der Faktoren II, V, VIII, XII und XIII nach 2.9 c gemessen. Fibrinogen wurde durch radiale Immundiffusion mit Partigenplatten (Behringwerke, Marburg) bestimmt.

	Fibrinogen mg%	Gerinnungsfaktoren				
		II (%)	V (%)	VIII (%)	XII (%)	XIII (%)
Puffer-Kontrolle	232	100	100	100	100	100
10 µg ELP/ml Plasma	220	71	64	46	100	100
100 µg ELP/ml Plasma	212	40	48	19	58	95

3. 6. EINWIRKUNG DER PROTEASEN AUF LYMPHOZYTEN

3. 6. 1 Einfluß auf die Lymphozytenstimulierung

3. 6. 1. 1 Stimulierung von T-Lymphozyten

a) Abhängigkeit von der Zeitdauer der Proteolyse

Mononucleäre Leukozyten oder Lymphozyten des menschlichen peripheren Blutes wurden, wie unter 2.7.1a beschrieben, mit den gereinigten Leukozytenproteasen vorinkubiert und die Proteolyse durch Zugabe von Serum gestoppt. Der ³H-Thymidineinbau nach 64 Std. Kultur in Gegenwart oder ohne

Zusatz des Mitogen (Tab. 14) zeigte, daß die Granulozytenproteasen alleine nicht als Mitogen wirken. In Gegenwart des Mitogens PHA führen sie jedoch zu einer deutlichen Zunahme der Lymphozytenproliferation gegenüber den Kontrollen ohne Enzymbehandlung.

Tab. 14: Wirkung der Leukozytenproteasen auf die Proliferation (^3H -Thymidineinbau) menschlicher peripherer Lymphozyten. x Inkubation der Zellen ($1,5 \cdot 10^6$ in 1,0ml): 0,5/ μg ELP bzw. CLP (in 0,1 ml) für 1 min. in Versuch 1; für 5 min. in Versuch 2.
xx PHA-Konzentration: 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Versuch 1; 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Versuch 2. Kulturbedingungen vergl. 2.7.1a; der ^3H -Thymidineinbau (ipm) ist als Mittelwert dreier identischer Ansätze angegeben.

Protease ^x	Mitogen ^{xx}	Versuch 1	Versuch 2
		Mononukl. Leukoz.	Lymphocyten
-	-	296	365
ELP	-	191	358
CLP	-	134	376
-	PHA	5845	2465
ELP	PHA	10714	15625
CLP	PHA	22477	9080

Die Abhängigkeit der Lymphozytenstimulierung von der Dauer der Vorinkubation mit den proteolytischen Enzymen ist in Abb. 29 dargestellt. Die Lymphozyten wurden mit 2 Konzentrationen von ELP und CLP über einen Zeitraum von 30 sec. bis 90 min. vorinkubiert und in Gegenwart von 1,25 bzw. 2,5/ μg PHA kultiviert. Wie die Abb. zeigt, führt bereits eine sehr kurze Vorinkubation mit ELP zu einer starken Zunahme des ^3H -Thymidineinbaus gegenüber der Kontrolle, wobei die höhere Enzymkonzentration bei der niedrigen PHA-Dosis den größeren Effekt zeigt und umgekehrt. Das Maximum der Aktivierung liegt bei 1 - 5 min. Danach nimmt die Aktivierung bei hohen Enzymkonzentrationen langsam ab, während sie bei der niedrigen rasch abfällt und nach 30 min. erneut ansteigt. Ähnlich verhält sich CLP bei der niederen

PHA-Dosis, wenngleich die höhere Enzymkonzentration keine ausgeprägte frühere Aktivierung zeigt. Bei der höheren PHA-Dosis wirkt sie sogar anfangs hemmend und zeigt erst nach 90 min. eine Aktivierung.

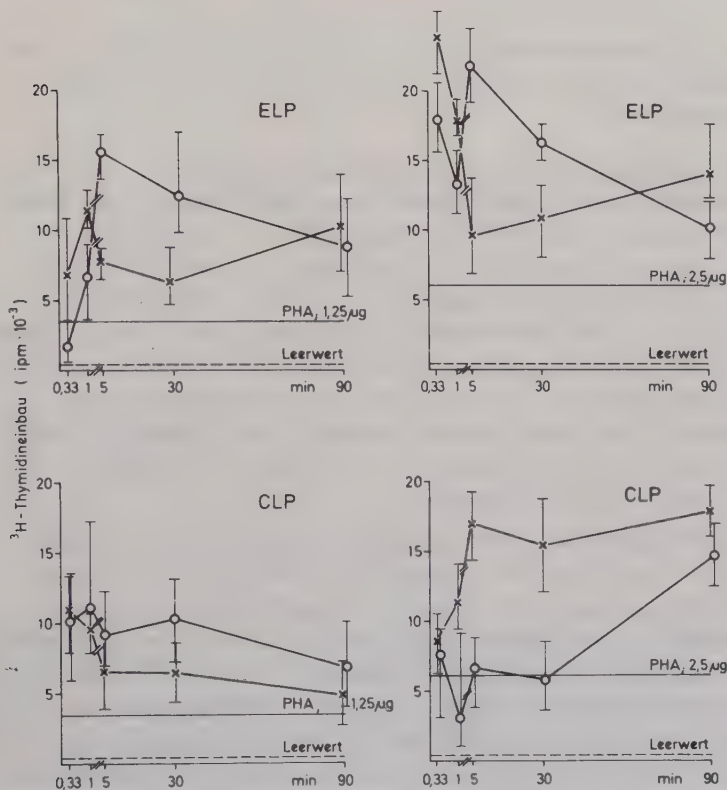


Abb 29: Abhängigkeit der Lymphozytenstimulierung durch PHA von der Zeitdauer der Vorinkubation mit ELP oder CLP. $0,75 \cdot 10^6$ Lymphozyten in 0,5 ml Medium 199 wurden mit 0,025 (x) und 0,25 μg (o) der beiden Leukozytenproteasen für 20 sec. bis 90 min. bei 25°C inkubiert und die Proteolyse mit 0,5 ml 40 % AB-Serum gestoppt. Nach Zugabe von 1,25 bzw. 2,5 μg PHA (0,05 ml) 64 Std. Kultur bei 37°C und 4 Std. Puls mit 2 μCi ^3H -Thymidin (336mCi/mM). Der Leerwert enthielt kein PHA. Der ^3H -Thymidineinbau (Mittelwert dreier identischer Ansätze und Standardabweichung) ist gegen die Zeitdauer der Proteasebehandlung aufgetragen.

Die Verwendung mononucleärer Leukozyten (80 - 90 % Lymphozyten und 10 - 20 % Makrophagen) anstelle gereinigter Lymphozyten führte zu einer niedrigeren Potenzierung der Lymphozytenstimulierung. Außerdem war ein Rückgang der Stimulierung nach 30 min. bei keiner Enzymkonzentration vorhanden.

Die Trypanblaufärbung nach Ende der Kultur zeigte in den enzymbehandelten und den Kontrollansätzen mehr als 90 % lebende Zellen.

b) Abhängigkeit von der Dosis des Mitogens

Die Abhängigkeit der Potenzierung des Lymphozytenresponse von der Dosis des Mitogen ist in Abb. 30 dargestellt. Lymphozyten wurden mit 0,05 und 0,5 μ g ELP für 5 min. vorinkubiert und in Gegenwart steigender PHA-Konzentrationen kultiviert. Die enzymbehandelten Lymphozyten zeigten gegenüber den Kontrollen eine vermehrte Proliferation. Das Maximum der Dosiskurve ist bei der hohen ELP-Konzentration außerdem nach niedrigeren PHA-Dosen verschoben. Im günstigsten Falle wird ein gegenüber der Kontrolle 8-fach höherer ^3H -Thymidineinbau gemessen.

Die proteolytische Behandlung mononucleärer Leukozyten mit CLP für eine bzw. neunzig Minuten (Abb. 31) zeigte ebenfalls eine Verschiebung des Maximums der Dosis-Wirkungskurve nach niedrigeren PHA-Dosen hin, aber nur eine geringfügige Erhöhung des Maximums. Im suboptimalen Dosisbereich der Kontrollkurve ist somit eine bestenfalls 2,5-fache Steigerung des Thymidineinbaues zu beobachten. Bei hohen PHA-Konzentrationen führt besonders die lange Vorinkubation mit CLP zu einer Hemmung des Thymidineinbaues gegenüber der Kontrolle.

Bei der Stimulierung mononukleärer Leukozyten mit 0,05 - 0,5 μ g ELP wurde, ähnlich wie bei CLP, bei niedrigen PHA-Dosen ebenfalls nur eine geringe Steigerung der DNS-Synthese beobachtet. Im Gegensatz zu CLP trat jedoch bei hohen PHA-Konzentrationen nur ein geringer Hemmeffekt auf.

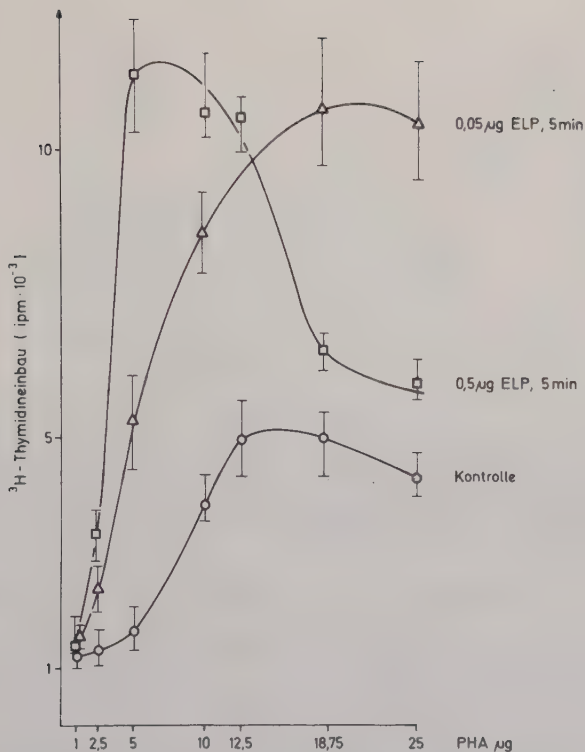


Abb. 30: Abhängigkeit der Verstärkung der Lymphozytenstimulierung durch ELP von der Dosis des Mitogens (PHA). $1,5 \cdot 10^6$ Lymphozyten in 1,0 ml Medium 199 wurden mit 0,05 (Δ) und 0,5 ($\square$) μg ELP für 5 min. vorinkubiert. Kontrolle: ohne Enzymbehandlung (o). Kultur: nach Zugabe von 1,0 ml 40 % AB-Serum und 0,1 ml der entspr. Mitogendosis wie bei Abb. 29.

c) Einfluß anderer Faktoren

Die Beeinflussung der Lymphozytenproliferation ist nur mit enzymatisch aktiven Leukozytenproteasen möglich. DFP inhibierte ELP hatte keinen Einfluß auf die Lymphozytenstimulierung durch die suboptimale PHA-Konzentration (Abb. 32). Die Vorinkubation der Protease mit AB-Serum führte zwar ebenfalls zur völligen Hemmung der proteolytischen Aktivität,

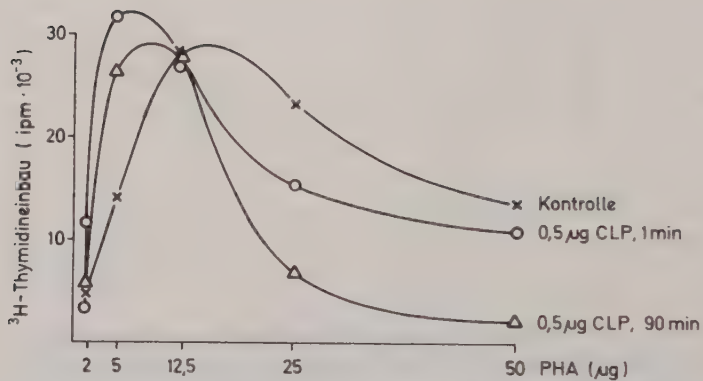


Abb. 31: Einfluß von CLP auf die PHA-Stimulierung mononukleärer Leukozyten in Abhängigkeit der Dosis des Mitogens $1,1 \cdot 10^6$ mononukleäre Leukozyten in 1,0 ml Medium 199 wurden mit $0,5 \mu\text{g}$ CLP für 1 min. (o) und 90 min. (Δ) vorinkubiert. Kontrolle: ohne Enzymbehandlung (x). Kultur nach Zugabe des Mitogens wie in Abb. 30.

konnte aber die Wirkung auf die Lymphozyten nicht aufheben. Es war ein, wenn auch gegenüber der Proteasebehandlung der Zellen geringer Effekt auf die Lymphozytenreaktion zu beobachten. Wurden die Protease und das Mitogen vor der Zugabe zu den Lymphozyten zusammen inkubiert, so war der Thymidineinbau niedriger als in der Kontrolle. Der proteolytische Abbau des Mitogens führt somit zum Verlust der mitogenen Eigenschaften.

Über die hier beobachtete Wirkung mittels Serumkomponenten hinaus, die vorerst nicht weiter untersucht wurde, entfalten die leukozytären Proteasen ihren Einfluß auf die Lymphozytenstimulierung durch direkten Angriff auf die Zellen, wie die Kinetik der Vorbehandlung der Zellen zeigte. Bei Stimulierung mit suboptimalen Mitogendosen war mit den angewandten Enzymmengen ($0,1 - 1 \mu\text{g}$) ein potenzierender Effekt zu beobachten. Dieser war bei Verwendung gereinigter Lymphozyten höher als bei mononukleären Leukozyten. Die absolute Höhe des ^3H -Thymidineinbaus schwankte jedoch

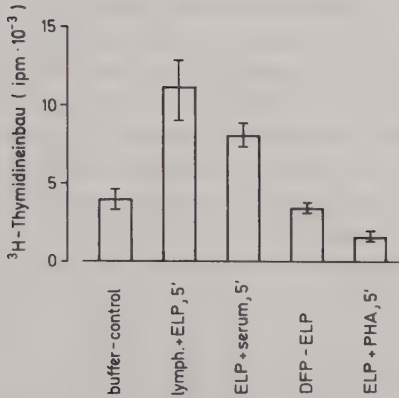


Abb. 32: Effekt der Vorinkubation der Lymphozyten (2.Säule), des Serums (3.Säule) und des Mitogens mit ELP (5.Säule) sowie der Vorinkubation der Lymphozyten mit DFP-inhibierter ELP (4. Säule) auf die Stimulierung der Lymphozyten ($1,5 \cdot 10^6$) mit PHA (2,5 µg). Kontrolle ohne Enzymbehandlung (1. Säule). Kulturbedingungen wie in Abb. 30.

bei Lymphozyten verschiedener Spender beträchtlich, ein Effekt, der ganz allgemein bei immunologischen Reaktionen in genetisch nicht einheitlichen, also nicht ingezüchteten Populationen zu beobachten ist. Ein weiterer Faktor, der auf die unterschiedliche Stimulierbarkeit gereinigter Lymphozyten durch Mitogen, wie auf das Ausmaß des potenzierenden Effektes der Proteasen Einfluß hat, ist die Verunreinigung durch Monozyten, die die Lymphozytenproliferation ebenfalls beeinflussen (97). Auch durch wiederholte Adhäsionen am Glas (vergl. 2.3.2) sind sie nicht völlig zu entfernen und sehr reine Lymphozytenpräparationen enthielten noch etwa 1 % Monozyten.

Weiterhin können noch andere Faktoren, wie der allgemeine Immunstatus des Blutspenders, Einfluß auf die Stimulierbarkeit der menschlichen Lymphozyten und auf die beobachteten Unterschiede in der Höhe der Potenzierung gehabt haben.

3. 6. 1. 2 Stimulierung von B-Lymphozyten

Da es nicht gelang, menschliche periphere Blutlymphozyten mit einem B-Zell-Mitogen ausreichend zu stimulieren, wurden die Versuche mit Lymphknotenzellen von BDFE-Mäusen durchgeführt. Die aus den Peritoneallymphknoten isolierten Lymphozyten wurden in Gegenwart von 1 % fötalem Kälberserum und von LpS, Cystein (Cys) oder beiden zusammen (LpS + Cys) für 48 Std. kultiviert und der ^3H -Thymidineinbau gemessen.

Die Einbauraten (ipm) sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Mitogen	ipm	
	Versuch 1	Versuch 2
Ø	240	410
Lps	1540	1390
Cys	1980	2160
Lps + Cys	53070	30470

Die gleichzeitige Gegenwart von LpS und Cystein führt zu einer Potenzierung der jeweiligen Einzelwirkung. Wegen der besseren Vergleichbarkeit wird im weiteren das Ausmaß der Stimulierung des Thymidineinbaus durch ELP und CLP jeweils auf die Pufferkontrolle gleich 100 % bezogen.

Die Lymphozyten wurden mit den Leukozytenproteasen für 1 - 60 min. vorinkubiert wie unter 2.7.1b beschrieben und zusammen mit dem oben angeführten Mitogen kultiviert. Ähnlich wie bei menschlichen Lymphozyten wirkten auch hier die Proteasen alleine nicht mitogen. Überraschenderweise ist jedoch eine Erhöhung des Thymidineinbaus zu beobachten, wenn die Proteasen erst nach dem Serum zu den Lymphozyten gegeben werden (Abb. 33a, 34a, Null-min.-Wert). Die Stimulierung der Lymphozyten mit LpS oder Cystein nach ELP-Behandlung führte zu einer enormen Steigerung der DNS-Synthese, die eine charakteristische Abhängigkeit von der Zeitdauer der Vorinkubation mit Proteasen zeigte.

Bei der Stimulierung mit LpS führte 15-minütige Einwirkung von ELP zu einem Maximum des Thymidineinbaues, dessen Höhe von der Protease-Konzentration abhängig ist und im vorliegenden Versuch bis zum 13-fachen der Kontrolle ansteigt (Abb. 33b). Die Lymphozytenaktivierung geht nach 30-minütiger Proteolyse deutlich zurück und steigt bei längerer Einwirkung wieder steil an. Bei der Stimulierung mit Cystein zeigt sich ein Maximum der Aktivierbarkeit nach 30 min. Einwirkung von ELP, das bei der höchsten hier verwendeten Enzymkonzentration das 10-fache der Kontrolle ausmacht (Abb. 33c). Es fällt hier besonders auf, daß die Nullwerte (Proteasezugabe erst nach Serumzusatz) einen erhöhten Thymidineinbau zeigen.

Die gleichzeitige Stimulierung mit LpS und Cystein führte bereits bei den Kontrollen zu einem sehr hohen Thymidineinbau (vergl. oben). Auch hier führte die Proteolyse mit ELP zu einem weiteren Anstieg, der bei 5 bis 15-minütiger Einwirkung ein Maximum aufweist und im günstigsten Falle das 3-fache der Kontrolle beträgt (Abb. 33d).

Die Einwirkung von CLP führte zu einer wesentlich geringeren Verstärkung der Proliferation der Mäuse-Lymphozyten als die ELP. Bei Stimulierung mit LpS führte die kurzzeitige Vorbehandlung (1 min.) mit CLP zu einer leichten Hemmung der DNS-Synthese. Erst die 60-min. Vorbehandlung mit CLP erbrachte eine ausgeprägte Steigerung des Thymidineinbaus, vor allem bei den niedrigen Enzymkonzentrationen.

Der hemmende Effekt der hohen Enzymkonzentrationen war bei Stimulierung mit Cystein deutlicher ausgeprägt und bei gleichzeitiger Stimulierung mit LpS + Cystein führte die kurzzeitige Inkubation bei allen Enzymkonzentrationen zu einer völligen Hemmung des Thymidineinbaus. Die normale DNS-Synthese stellte sich bei längerer Proteasebehandlung wieder ein, am langsamsten jedoch bei der hohen CLP-Konzentration.

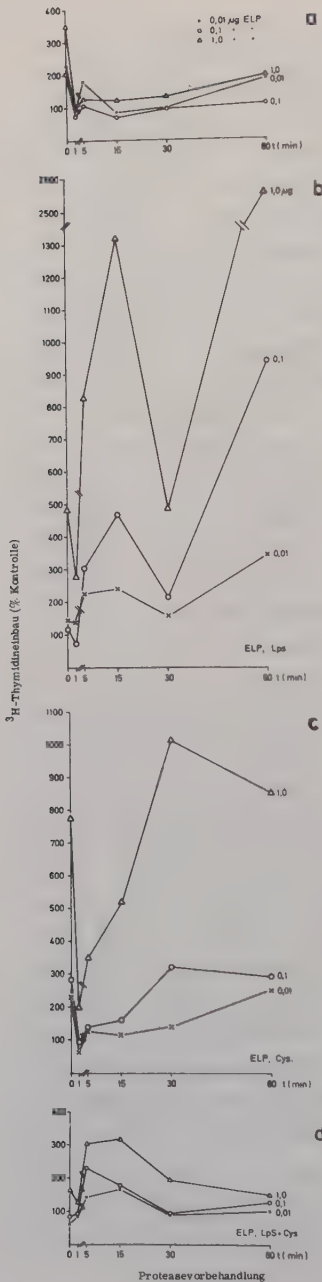


Abb. 33

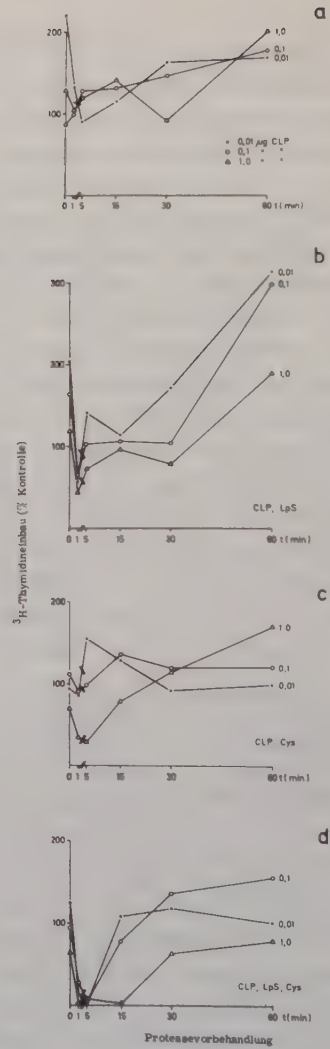


Abb. 34

3. 6. 2 Beeinflussung der Mitogenbindung durch Lymphozyten

Gereinigte Lymphozyten wurden nach Vorbehandlung mit ELP in der Kälte mit steigenden Mengen ^{125}J -markierten PHA inkubiert. Nicht gebundenes Mitogen wurde ausgewaschen und die Zellen zur Autoradiographie auf gelatinierten Objektträgern ausgestrichen bzw. zur quantitativen Messung des gebundenen ^{125}J in 0,1 % Triton X 100 aufgelöst und im Gamma-Zähler gemessen. Die Autoradiographie zeigte, daß das Mitogen von der gesamten Lymphozytenpopulation gleichmäßig stark gebunden wird. Die quantitative Messung ergab mit steigender PHA-Dosis eine Zunahme des gebundenen Mitogens. Die Vorinkubation der Lymphozyten mit 0,05 und 0,5 μg ELP für 1 min. verursachte keine Erhöhung der Mitogenbindung in dem Dosisbereich, in dem die Protease ihre potenzierende Wirkung ausübte (Abb. 35) (vergl. Abb. 30).

2,5 μg ELP führten zu einer etwas geringeren Bindung des Mitogens als in der Kontrolle. Die 60-minütige Vorbehandlung der Lymphozyten mit 0,05 μg ELP verursachte eine nur unwesentlich bessere Bindung von PHA, während 0,5 μg ELP zu einer geringen und 2,5 μg zu einer starken Verminderung der PHA-Bindung führten.

Abb. 33: Abhängigkeit der Stimulierung von Lymphozyten aus Lymphknoten der Maus von der Zeitdauer der Vorinkubation mit ELP.

Abb. 34: Abhängigkeit der Stimulierung der Mäuse-Lymphozyten von der Zeitdauer der Vorinkubation mit CLP.

Die Lymphozyten ($1,2 \cdot 10^6$ in 0,4 ml) wurden mit 0,01, 0,1 und 1,0 μg der Protease (0,05 ml) für 1 - 60 min. vorinkubiert und nach Abstoppen mit 10 % fötalem Kälberserum (0,05 ml) und Zugabe des Mitogens wurde für 48 Std. bei 37°C kultiviert und die DNS-Synthese gemessen (vergl. 2.7.1b). Folgende Mitogene wurden verwendet:

- a) kein Mitogen
- b) 5 μg LpS
- c) Cystein (Endkonzentration: 10^{-3}M)
- d) LpS + Cystein (Konzentration wie b und c).

Der ^3H -Thymidineinbau (in % der Kontrolle ohne Enzymbehandlung) ist gegen die Zeitdauer der Proteasebehandlung aufgetragen.

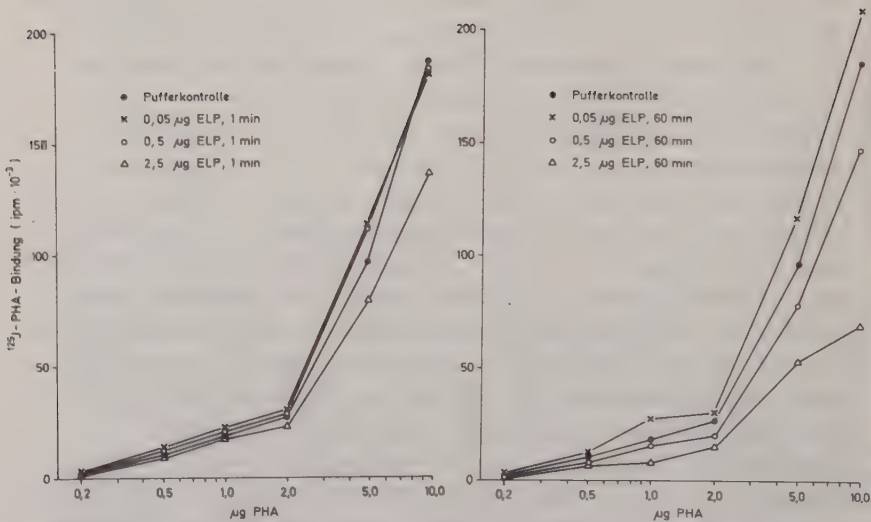


Abb. 35: Einfluß der Proteasebehandlung auf die PHA-Bindung gereinigter menschlicher Lymphozyten. ELP-Behandlung: 1 min. (linker Teil) und 60 min. (rechter Teil); danach Inkubation mit ^{125}I -markiertem PHA für 30 min. bei 4°C und Entfernen des nicht gebundenen Mitogens durch rasche Filtration (siehe 2.7.4). Die zellgebundene Radioaktivität ist gegen die Dosis des Mitogens aufgetragen.

3. 6. 3 Wirkung auf Rezeptoren an der Lymphozytenmembran

3. 6. 3. 1 Rezeptoren von T-Lymphozyten

Menschliche T-Lymphozyten zeichnen sich durch die merkwürdige Eigenschaft aus, Schafserythrozyten in einer Art Rosette anzulagern und relativ fest zu binden. Um die Beeinflussung dieser Rosettenbildung durch die Leukozytenproteasen zu untersuchen, wurden die Lymphozyten mit den Proteasen vorinkubiert und nach Zugabe von Serum mit unbehandelten oder Neuraminidase-behandelten Schafserythrozyten inkubiert. Die Zahl der gebildeten Rosetten wurde im Mikroskop ausgezählt. Der Anteil rosettenbildender Zellen (RFC) in den Kontrollen beträgt etwa $56 \pm 2\%$ bei Verwendung

unbehandelter und 60 - 65 % bei Neuraminidase-behandel-
ten Erythrozyten und stimmt mit den Literaturwerten über-
ein (Abb. 36). Die Proteasebehandlung führt zu einer Zu-
nahme der rosettenbildenden Zellen. Gleichzeitig steigt
die Zahl der Zellen, die 8 und mehr Erythrozyten gebunden
haben von 35 auf 60 % an und die Rosetten werden stabiler
gegen mechanische Einflüsse (Schütteln, Pipettieren).

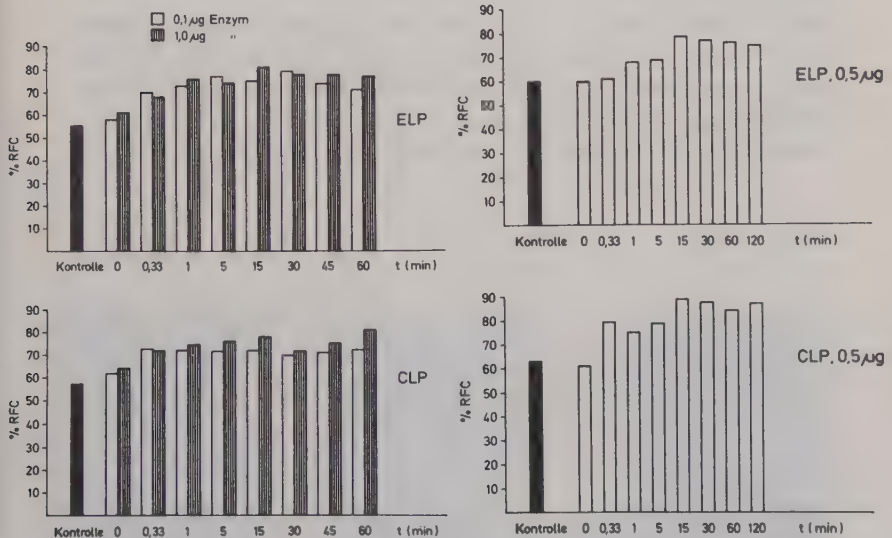


Abb. 36: Einfluß der Proteasebehandlung gereinigter Lympho-
zyten auf die Fähigkeit der Rosettenbildung mit unbehandel-
ten (linker Teil) und Neuraminidase behandelten Schafsery-
throzyten (rechter Teil).

Proteasevorbehandlung: 20 sec. bis 120 min. mit ELP
(obere Reihe) und mit CLP (untere Reihe).

Einzelheiten des Ansatzes siehe 2.7.2.

Der Anteil rosettenbildender Zellen ist in Abhängigkeit
von der Zeitdauer der Proteasebehandlung dargestellt.

3. 6. 3. 2 Rezeptoren von B-Lymphozyten

Oberflächenimmunglobuline

Etwa 20 - 30 % der Lymphozyten des peripheren Blutes tragen Immunglobuline auf der Zellmembran, mit der sie Antigene spezifisch erkennen können. Die Zahl dieser immunglobulintragenden Zellen wurde mit ^{125}J -markiertem Anti-Immunglobulin-Serum autoradiographisch bestimmt (vergl. 2.7.3.1).

Bei Vorinkubation der Lymphozyten mit den Leukozytenproteasen sank die Zahl der durch das Antiserum markierten Zellen gegenüber den Kontrollen ab. Dieser Abfall war bei Behandlung mit CLP weniger stark ausgeprägt und nur bei kurzen Inkubationszeiten nachweisbar (Abb. 37).

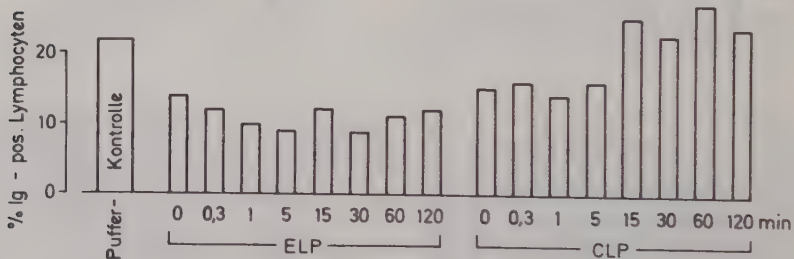


Abb. 37: Veränderungen der Zahl Oberflächenimmunglobulintragender Lymphozyten durch proteolytische Behandlung mit ELP und CLP. Ansatz siehe 2.7.3.1.

In weiteren Versuchen wurden Lymphozyten nach Vorbehandlung mit den Leukozytenproteasen zuerst mit dem ^{125}J -markierten Antiserum inkubiert und nach dem Auswaschen des nichtgebundenen Anteils einer Rosettenbildung mit Neuraminidase-behandelten Schafserythrozyten unterworfen (Tab. 15). Es wurde wiederum ein Anstieg der rosettenbildenden Lymphozyten und eine Abnahme der Zellen mit Oberflächenimmunglobulin gefunden. Weiter zeigte sich jedoch, daß nach Enzymbehandlung etwa 10 % der Lymphozyten sowohl Rosetten bilden wie Immunglobulin an der Oberfläche tragen, also Oberflächenmerkmale von B- und T-Lymphozyten aufweisen (Abb. 38).

Tab. 15: Doppelmarkierung von Lymphozyten nach Proteasebehandlung. $2,0 \cdot 10^6$ Lymphozyten wurden für 5 und 120 min. mit ELP bzw. CLP inkubiert, mit Serum abgestoppt und gewaschen; dann Behandlung mit ^{125}J -markiertem Antiimmunglobulinserum (vergl. 2.7.3.1), Waschen und Rosettenbildung mit Neuraminidase-behandelten Schafserythrozyten (vergl. 2.7.2b). Auszählung der Ausstriche nach Autoradiographie.

	Kontrolle	0,5 μg ELP		0,5 μg CLP	
		5 min	120 min	5 min	120 min
% E_N -Rosetten	55 ± 2	72	71	75	74
% Ig - positive Lymphocyten	21 ± 2	11	14	19	16
% doppelmarkierte Lymphocyten	1 ± 1	10	12	14	8

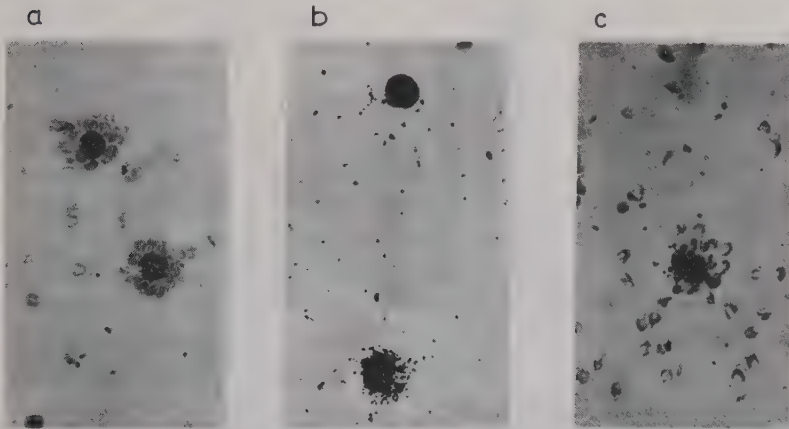


Abb. 38: Mikroskop-Fotographien

- a) Rosettenbildende Zellen nach Behandlung mit Schafserythrozyten (siehe 2.7.2) (T-Lymphocyten),
b) Lymphozyt mit Oberflächenimmunglobulin (unten) nach Behandlung mit ^{125}J -Antihuman Igl. (siehe 2.7.3.1) (B-Lymphozyt),
c) doppelmarkierte Zelle mit Oberflächenimmunglobulin und angelagerten Schafserythrozyten.

C₃-Rezeptoren

B-Lymphozyten können sowohl die freie wie die im EAC-Komplex vorliegende Komplement-Komponente C₃ binden. Mit der unter 2.7.3.2 beschriebenen Rosettenmethode bilden etwa 20 % der peripheren Blutlymphozyten diese "Komplementrezeptorrosetten" aus (Abb. 39). Die Vorinkubation der Lymphozyten mit den Leukozytenproteasen führt im Falle der ELP zu einer Zunahme der Zahl rosettenbildender Zellen, während CLP in der höheren Konzentration zu einer Abnahme führt. Unbehandelte, wie proteasebehandelte Lymphozyten bilden unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen keine Rosetten mit normalen oder Amborezeptor-beladenen Erythrozyten. Die Bindung der Erythrozyten erfolgte also spezifisch über die angelagerte dritte Komplementkomponente.

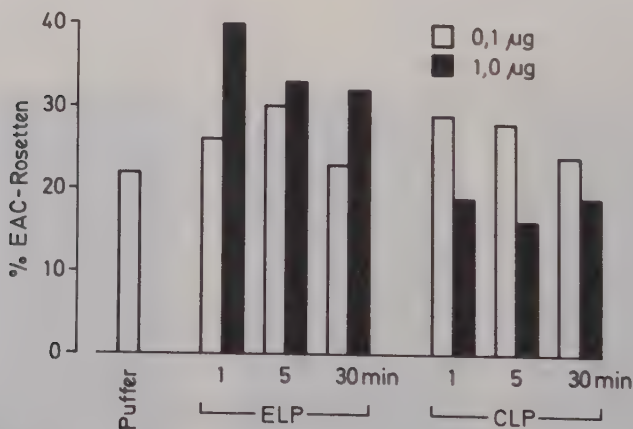


Abb. 39: Einfluß der Leukozytenproteasen auf die C₃-Rezeptoren. Lymphozyten ($2 \cdot 10^6$) wurden mit 0,1 und 1,0 µg ELP oder CLP für 1, 5 und 30 min. inkubiert; nach Abstoppen mit Serum und Waschen erfolgte die Rosettenbildung mit EAC-Komplexen (vergl. 2.7.3.2). Der Anteil rosettenbildender Zellen ist in Abhängigkeit von der Proteasebehandlung dargestellt.

4 DISKUSSION

4. 1 Vorkommen und Reinigung

Die Ergebnisse zeigen, daß menschliche polymorphkernige Leukozyten zwei Gruppen von neutralen Proteasen enthalten, die beide Hämoglobin und Fibrinogen abbauen, sich aber im Molekulargewicht und im elektrophoretischen Verhalten unterscheiden:

- a) eine elastaseähnliche Protease mit Esteraseaktivität gegenüber BOC-Ala-ONp und
- b) eine chymotrypsinähnliche Protease, die Naphtyl- und p-Nitrophenyl-Ester aromatischer Aminosäuren spaltet.

Die Proteasen sind zusammen mit β -Glucuronidase in den azurophilen oder primären Granula lokalisiert. Sie sind in diesen Granula wahrscheinlich als aktive Enzyme vorhanden, denn 1) wurde bei den Aktivitätsmessungen niemals eine lag-Phase beobachtet, die auf eine Aktivierung schließen ließe und 2) wurde auch bei Extraktion und Auftrennung bei sauren pH (vergl. 3.3.1e) dieselbe Zahl von Proteasebanden mit der gleichen elektrophoretischen Beweglichkeit gefunden, wie sie ELP und CLP aufweisen. Im Gegensatz zur β -Glucuronidase sind beide neutrale Proteasen jedoch sehr fest an die sauren Mucopolysaccharide der lysosomalen Membran gebunden (14), die ihre stark positive Ladung neutralisieren. Nach Extraktion der Granula mit hochmolarer Kochsalzlösung wurden die beiden Enzyme mit den üblichen Reinigungsmethoden der Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie in hoher Reinheit isoliert.

Bei den für die Elektrophorese erforderlichen niedrigen Ionenstärken kommt es bei CLP zur Bildung von Aggregaten, die im Gelsystem nach REISFELD etwa 10 % des Proteins ausmachen (vergl. 3.2.2). Ähnliche Aggregationserscheinungen wurden auch von anderen Autoren bei basischen Proteinen beobachtet (14, 98). Wegen der Probleme bei der Gewinnung ausreichender Mengen an Granulozyten von gesunden Spendern wurde eine weitere Auftrennung der ELP und CLP in elektrophoretische Einzelbanden nicht vorgenommen.

Die für die Reinigung chymotrypsinähnlicher Proteasen beschriebene Methode der Affinitätschromatographie an Agarosegebundenen D-Tryptophanmethylester (99) erwies sich als sehr wirkungsvoll bei der raschen Anreicherung sowohl von CLP wie von ELP aus Gesamtextrakt von Granulozyten (siehe 3.2.4).

4. 2 Eigenschaften

Die elastaseähnliche Proteaseaktivität wurde schon früher in menschlichen PMN nachgewiesen (35, 33, 36, 100). Vor kurzem wurde von JANOFF die Reinigung der granulozytären Elastase durch Affinitätschromatographie an Agarose- ϵ -Aminocapryl-alanyl-alanyl-alanin beschrieben (101). Die Ergebnisse wurden von OHLSSON und OLSSON bestätigt, wobei diese Autoren Gelfiltration und Kationenaustauschchromatographie in Verbindung mit Affinitätschromatographie an Sepharose-gebundenem Elastin zur Reinigung verwandten (102). Die Autoren zeigen, daß die Elastase aus menschlichen Granulozyten aus drei Proteinen besteht. Dieser Befund kann durch die vorgelegten Ergebnisse bestätigt werden. Zusätzlich zu den drei Proteasen konnten jedoch noch drei weitere Proteine mit enzymatischer Aktivität nachgewiesen werden.

Aus den Ergebnissen von JANOFF und OHLSSON ist ersichtlich, daß noch weitere Proteine in ihren gereinigten Elastasepräparationen enthalten sind, über deren enzymatische Aktivität jedoch nichts ausgesagt wird.

Neben der elastaseähnlichen Aktivität konnte in den primären Granula von PMN eine chymotrypsinähnliche Aktivität aufgrund der Esterolyse von Acetyltyrosinäthylester bestimmt werden. Angaben der Reinigung dieses Enzymes lagen bisher in der Literatur nicht vor. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene chymotrypsinähnliche Protease aus primären Granula von PMN zeigte nur geringe Aktivität gegenüber Acetyltyrosinäthylester, hydrolysierte jedoch andere Chymotrypsinsubstrate wie Naphthyl- oder p-Nitrophenylester von Phenylalanin oder Tyrosin sehr rasch. CLP zeigte in der

Polyacrylamidelektrophorese drei stark kationische Proteine: zwei Proteine wanderten schneller als Lysozym, eine etwas langsamer als Lysozym.

Vor kurzem wurde von RINDLER et al. (98) ein Acetyltyrosin-äthylester-spaltendes Enzym aus menschlichen Granulozyten isoliert, das ebenfalls aus drei kationischen Proteinen besteht und aufgrund der relativen elektrophoretischen Beweglichkeit bezogen auf Lysozym mit der hier beschriebenen CLP identisch zu sein scheint.

Seit längerer Zeit sind in der Literatur Hinweise vorhanden, daß in Granulozyten eine Reihe von Esterasen vorkommt, die im neutralen Bereich wirksam sind. Als unspezifisches Substrat wurde Naphthol-AS-D-Chloracetat verwendet (103). In Aufschlüssen von Granulozyten-Granula ließen sich hiermit zahlreiche Esterasebanden elektrophoretisch nachweisen (104, 105), die jetzt fast alle den Proteinenbanden der ELP und CLP zuzuordnen sind. Die auffällige Heterogenität sowohl der ELP wie der CLP ist nicht durch elektrophoretischen Polymorphismus oder durch partielle Proteolyse während der Enzymreinigung verursacht, wie unter 3.3.1d gezeigt wurde. Möglicherweise ist die unterschiedliche Amidierung der Carboxylgruppen saurer Aminosäuren des Enzymproteins für die Ladungsunterschiede verantwortlich. Die Frage, ob genetisch determinierte Isoenzyme die Ursache dieser Heterogenität sind, müßte durch eine Aminosäureanalyse der getrennten Proteinbanden geklärt werden.

Im Gegensatz zu OHLSSON, der für die einzelnen Proteinbanden der ELP ein Molekulargewicht von 33.000 bis 36.000 in der SDS-Elektrophorese findet (102), wurde hier durch Gelchromatographie ein mittleres Molekulargewicht von 27.000 D ermittelt und durch Elektrophorese im SDS-Gel ein Molekulargewicht von 27.000 D für das Hauptprotein und von 29.000 D und von 31.000 D für die beiden anderen Proteine (siehe 3.3.1b).

Das gegenüber OHLSSON unterschiedliche Molekulargewicht ist möglicherweise dadurch bedingt, daß dieser das Enzym aus

Granulozyten von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie isolierte, die einen hohen Anteil unreifer Vorstufen enthalten, während wir normale Granulozyten gesunder Spender als Enzymquelle verwandten.

Das Molekulargewicht von CLP wurde durch Gelchromatographie und Elektrophorese in Gegenwart von SDS zu 18.000 D bestimmt. Ein Vergleich mit Angaben der Literatur ist bisher nicht möglich.

Die Leukozytenproteasen erwiesen sich aufgrund ihres Wirkungsoptimums gegen Protein- und Estersubstrate im neutralen pH-Bereich als neutrale Proteasen. Auffällig ist, daß ELP bis in den alkalischen Bereich aktiv ist. ELP ist in seiner Aktivität gegen denaturiertes Hämoglobin mit Trypsin vergleichbar, während CLP geringere Aktivität zeigt. Proteinsubstrate mit einem hohen Anteil unpolarer Aminosäuren werden von den Enzymen bevorzugt angegriffen. Der hydrophobe Charakter der Substratbindungsstelle zeigt sich auch in der Substratspezifität gegenüber Aminosäureestern. Weitere Hinweise sind die Adsorption an sepharosegebundenen D-Tryptophanmethylester und die Ablösbarkeit von diesem Träger durch Äthylenglycol.

JANOFF (101) und OHLSSON (102) haben gefunden, daß Serum potente Inhibitoren gegen ELP enthält. In Übereinstimmung damit zeigt die vorliegende Arbeit, daß beide Leukozytenenzyme durch α_1 -Antitrypsin und durch α_2 -Makroglobulin vollständig gehemmt werden. α_1 -Antichymotrypsin erwies sich als spezifischer Inhibitor für CLP. In geringerem Ausmaße werden beide Enzyme auch durch polyvalente Proteinaseinhibitoren aus Leguminosen und Rinderpankreas gehemmt. Durch ihre Hemmbarkeit mit Diisopropylphosphorfluoridat weisen sich die Leukozytenproteasen als Serinesterasen aus (E. C. 3.4.21).

4. 3 Abgrenzung gegen andere Proteasen

ELP und CLP sind wie die Pankreasenzyme Elastase und Chymotrypsin , mit denen sie in ihrer Substratspezifität vergleichbar sind, Serin-Proteinasen. Sie werden jedoch nicht als Zymogene abgegeben, sondern liegen bereits in den Lysosomen als vollaktive Enzyme vor. Im Gegensatz zur Elastase aus Schweinepankreas (106) zeigt ELP bei etwa gleichem K_M -Wert eine niedrigere Katalysekonstante gegenüber Z-Ala-ONp. Weiterhin unterscheidet sich ELP durch ein höheres Molekulargewicht, durch eine kleinere elektrophoretische Beweglichkeit und durch ein sehr breites pH-Spektrum von diesem Enzym, (siehe Tabelle).

Im Unterschied zu α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas (107) besteht CLP nur aus einer Polypeptidkette. Sie zeigt ein niedrigeres Molekulargewicht, eine höhere elektrophoretische Beweglichkeit und ein niedrigeres pH-Optimum als das Pankreasenzym.

Vor kurzem wurde von GERBER et al. (108) aus menschlichen Granulozyten eine chymotrypsinähnliche Protease isoliert, die ein höheres Molekulargewicht als CLP besitzt und aus Untereinheiten besteht. Weiterhin zeigt sie ein niedrigeres pH-Optimum und eine geringere elektrophoretische Beweglichkeit bei pH = 4,5 und wird durch 1,4 Dithiothreitol gehemmt. Durch seine Aktivität gegenüber Acetyltyrosinäthylester hat dieses Enzym Ähnlichkeit mit der von RINDLER et al. (98) in Granulozyten beschriebenen chymotrypsinähnlichen Protease. Im Verlaufe der hier beschriebenen Trennung wird das von GERBER et al. beschriebene Enzym wahrscheinlich bei der Sephadex G 100-Chromatographie von der CLP abgetrennt und befindet sich in der Fraktion mit Molekulargewicht 50 - 100.000, die eine geringe Esteraseaktivität gegen Ac-Phe-ONaph aufweist (Abb. 3).

Eine neutrale chymotrypsinähnliche Protease wurde von KAWIAK et al. (109) aus Rattenmastzellen isoliert. Dieses Enzym hat jedoch ein höheres Molekulargewicht als CLP und

Tabelle: Gegenüberstellung von ELP, LCP und anderen neutralen Proteasen.

Enzym	Herkunft	Lit.	Mol.Gew.	IP	Protein-Substrate (pH-Opt.)	Ester-Substrate	Inhibitoren	Besondere Eigenschaften
ELP	human PMN		27 - 30 000	10,1	Hämoglobin Fibrinogen Elastin pH 8,0	BOC-Ala-ONp	DFP, AChA, CK α_1 AT, α_2 M	3 Hauptproteine i.d. Page
Elastase [C.C. 3,4, 21,11]	Schweine- pankreas	106,116	25 900	9,5	Elastin (ungel. oliphot. AS) pH 8,8	BOC-Ala-ONp	DFP, AChA, CK α_1 AT	Zymogen
El.dhnl.Pro- tease, JANOFF et al.	human PMN	101	-	-	Elastin	BOC-Ala-ONp	α_1 AT	2 Proteine i.d. Page
El.dhnl.Pro- tease Kle.Zellen OH.SSON et al. (human)	myelo.-leu- käm.Zellen (human)	102	33 - 36 000	-	Elastin pH 8,5	-	α_2 AT, α_2 M	3 Proteine i.d. Page
Elastase	Pseudomonas aeruginosa	104	22 300	6,5	Elastin, pH 7,0 Casein, pH 8,3	-	DFP, EDTa	
CLP	human PMN		18 - 20 000	11,4	Hämoglobin Fibrinogen pH 7,5	BOC-Phe-ONp	DFP α_1 AT, α_2 M α_1 AC	3 Proteine i.d. Page (vor Lysozym)
Chymotryps. E.C.3.4.21.1 pankreas	Schweine- pankreas	107,115	25 300	9,1	Hämoglobin (Tyr, Trp, Phe, Leu) pH 7,9	BOC-Phe-ONp Ac-Tyr-OMe	DFP, TPCK α_1 AT, α_2 M α_1 AC	Zymogen mehrere Peptidketten
Ch.dhnl.Pro- tease SANTIER et al.	human PMN	98	-	-	Casein pH 7,5	Ac-Tyr-OMe	α_1 AT, α_1 AC	2 Proteine i.d. Page (vor Lysozym)
Ch.dhnl.Pro- tease GERBER et al.	human PMN	108	50 - 70 000	-	-	Ac-Tyr-OMe pH 7,2	DFP 1,4 - Dithiothreitol	2 Untereinheiten (i. Page langamer als Chymo- trypsin)
Ch.dhnl.Pro- tease Kle.Zellen Matsuk et al.	Rattenmast- zellen	109	25 000	-	-	B-Tyr-OMe pH 8,0	DFP, TPCK	Kationisches Protein hohe Affinität für Spho- den und Acetylcholin
Neutr. Prote- ase JAVIES et al.	Kaninchen PMN	110	-	-	Histone (Arg) pH 7,3	-	Serin	trypsinähnlich hydrolysiert Hämoglobin nicht Adsorption an anion. Polyelektrolyte
Kollagenase	human PMN	114	76 000	-	Kollagen pH 8,5	-	α_1 AT, α_2 M EDTA	2 Untereinheiten
Plasmin E.C.3.4.21	human	111	75 000	-	Fibrin	T-Ara-OMe	DFP, α_2 M	Zymogen; trypsinähnlich

zeigt bei niedrigen Ionenstärken ein wesentlich stärkeres Adsorptionsverhalten an Sephadex oder Acrylamidgelen.

Die von DAVIES et al. (110) aus azurophilen Granula von Kaninchen PMN isolierte neutrale Protease unterscheidet sich von den Enzymen aus menschlichen PMN durch eine unterschiedliche Substratspezifität, die es als trypsinähnliches Enzym ausweist. Es scheint jedoch ebenfalls ein basisches Protein zu sein, da es mit Heparin und Polyanionen Komplexe bildet.

Aufgrund ihrer fibrinogen- und fibrinspaltenden Aktivität zeigen die beiden Leukozytenproteasen Ähnlichkeit zu Plasmin, das jedoch als trypsinähnliches Enzym eine andere Substratspezifität besitzt und sich auch im Molekulargewicht und anderen physikalisch-chemischen Eigenschaften von den Leukozytenenzymen unterscheidet (111). Weitere Unterschiede bestehen im Verhalten gegenüber Serumproteinaseinhibitoren (112). Die gleichen Unterscheidungsgründe gelten für den Hagemannfaktor, der aus PMN isoliert worden ist (113) und für Kallikrein. Die ebenfalls aus menschlichen PMN isolierte Kollagenase (37, 114) unterscheidet sich von den hier beschriebenen neutralen Proteasen durch ein höheres Molekulargewicht und eine andere Substratspezifität sowie durch die Hemmbarkeit durch EDTA.

4. 4 Biologische Bedeutung der neutralen Proteasen

Es ist seit langem bekannt, daß PMN in akut entzündlichen Geweben neben ihrer heilsamen Rolle bei der Phagozytose von Mikroorganismen und Immunkomplexen für das betroffene Gewebe auch schädigend sein können, indem sie Proteasen freisetzen, die vasculäre Basalmembranen, Kollagen, Elastin und die Proteoglykane der Knorpelmatrix angreifen (12,45). Aus indirekten Hinweisen wurde geschlossen, daß eine leukozytäre Elastase am Abbau von Elastin bei akuter Arteritis und Emphysemen beteiligt ist (19).

Vor kurzem wurde gezeigt, daß dieses Enzym in vitro auch durch Autoklavieuen abgetötete Bakterien angreift (117).

Außerdem bleibt im Gegensatz zur Ratten-PMN (16) das pH in der Verdauungsvakuole während der und noch beträchtliche Zeit nach der Phagozytose im neutralen Bereich (118). Das legt eine Funktion der neutralen Proteasen auch bei der intrazellulären Verdauung bestimmter Mikroorganismen nahe. Die Aktivitäten von ELP und CLP gegenüber mikrobiellen Membranen oder Bindegewebsbestandteilen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeiten nicht weiter untersucht.

4. 4. 1 Freisetzung der neutralen Proteasen in vitro

In Gegenwart von Antigen-Antikörperkomplexen, Endotoxin und Polynukleotiden wird ELP von PMN aktiv ins Medium abgegeben. Eine Freisetzung von CLP war unter diesen Bedingungen jedoch nicht nachweisbar. Wahrscheinlich wird die Abgabe durch die sehr feste Bindung an die Lysosomenmembran verhindert. Wie von HENSON (17) und WEISSMANN et al. (18) für β -Glucuronidase und andere lysosomale Enzyme gezeigt, ist die Freisetzung von ELP aus PMN nicht mit einem Verlust der Vitalität der Zelle verbunden. Die aktive Freisetzung von neutralen Proteasen aus menschlichen PMN wurde vor kurzem von anderen Autoren bestätigt (119 - 121). Kaninchen-PMN geben neben Kathepsinen (122) und einer neutralen Protease (123) auch stark kationische Proteine ins Medium ab (122, 124). Eine andere Art der Neutralisation der basischen Proteine in den Granula (z.B. Bindung von Heparin) mag für diesen Unterschied zu den menschlichen PMN verantwortlich sein. Die in Art einer umgekehrten Endocytose erfolgende Abgabe lysosomaler Enzyme nach außen scheint durch die intrazellulären Konzentrationen von cyclischen AMP und cyclischen GMP reguliert zu werden (125 - 127). Pharmakologische Reagentien wie Theophillin (Hemmung der c AMP-abbauenden Phosphodiesterase) und Prostaglandin E (Aktivierung der Adenylcyclase und Erhöhung des c AMP-Spiegels) wirken synergistisch in der Hemmung der Enzymfreisetzung. Andererseits bewirkt eine Erhöhung des c GMP-Spiegels durch Carbamylchlorid oder Acetylcholin eine vermehrte Enzymabgabe ohne Beeinflussung der Phagozytose. Das cytoplasmatische

System der Mikrotubuli scheint dabei der Angriffspunkt der cyclischen Nukleotide zu sein (127).

4. 4. 2 Wirkung auf Plasmaproteine

Es wurde gezeigt (vergl. 3.4), daß die beiden leukozytären Proteasen die Gerinnungsfaktoren VIII und XII sehr rasch abbauen. Weiterhin zeigte ELP starke Aktivität gegenüber Fibrinogen, Faktor II, V und XIII.

Der Abbau von Fibrinogen durch PMN-Proteasen war schon vorher nachgewiesen worden (25 - 30, 32, 33, 112) und scheint, wie die Versuche zeigten, hauptsächlich durch ELP verursacht zu sein. Verschiedene Autoren haben auch Plasminogen-Aktivator-Aktivität in Leukozyten nachgewiesen (32, dort weitere Literaturhinweise). Da sowohl ELP und CLP wie auch die gereinigten Gerinnungsfaktoren frei von Plasminogen waren, kann die proteolytische Aktivität der Enzympräparationen nicht durch Plasminogen-Aktivator oder Plasmin erklärt werden.

Trotz des hohen Antiproteasepotentials führt auch die Zugabe von ELP zum Plasma zu einer Inaktivierung verschiedener Gerinnungsfaktoren (Vergl. Tab. 13). Eine hohe Affinität des Enzyms gegenüber diesen Substraten, die auch in vitro rasch abgebaut werden, könnte die Ursache der ELP-Aktivität im Plasma sein.

Natürlich geben diese in vitro-Untersuchungen des Abbaus von Gerinnungsfaktoren durch die beiden PMN-Proteasen noch keinen Hinweis auf die möglichen Effekte dieser Enzyme auf das Gerinnungssystem in vivo. Da jedoch gezeigt wurde, daß menschliche PMN in Gegenwart von Endotoxin, Antigen-Antikörperkomplexen, Polynukleotiden und während Phagozytose aktiv ELP ins Medium freisetzen, erhebt sich die Frage, ob nicht einige Typen der sogenannten dissiminierten intravasculären Gerinnung eine Folge der direkten Proteolyse durch diese PMN-Protease sein können. Wie schon von MERSKEY (128) hervorgehoben wurde, sind Thrombin und Plasmin nicht die

einzigsten Enzyme, die Fibrinogen in vivo angreifen können. Durch intradermale Injektion in granulopenische Kaninchen wurde von THOMAS (129) gezeigt, daß Komponenten von PMN-Granula, die auch während der Phagozytose in den Extrazellulärraum abgegeben werden, sowohl Artus- wie Schwarzmann-Reaktionen verursachen. Diese Ergebnisse, die mit unfractionierten Granulaextrakten gewonnen wurden, konnten mit den gereinigten PMN-Kathepsinen D und E nicht reproduziert werden (130). Das könnte auf die Beteiligung anderer Granulakomponenten, wie z.B. die hier beschriebenen neutralen Proteasen hinweisen. Die Beteiligung proteolytischer Enzyme wird durch die Hemmbarkeit der hämorrhagischen Reaktionen durch Proteaseinhibitoren nahegelegt (131). Vor kurzem wurde durch das Auffinden von ELP- α_1 -Antitrypsin-Komplexen in Plasma von Patienten mit akuter Leukämie und einigen Patienten mit gramnegativer Sepsis ein direkter Hinweis erbracht, daß die bei diesen Patienten beobachteten Gerinnungsstörungen durch die PMN-Protease verursacht sein könnten (132). Im Gegensatz zu den in vitro-Untersuchungen im Plasma, die keinen Fibrinogen- und Faktor XIII-Abbau zeigten (vergl. Tab. 13), sind diese beiden Faktoren im Plasma dieser Patienten oft stark reduziert.

Andererseits war bei den Patienten nur eine leichte Erniedrigung des Faktor VIII-Spiegels zu beobachten, während dieser Faktor bei den in vitro-Experimenten mit Normalplasma am schnellsten abgebaut wurde. Diese Diskrepanzen könnten ihre Ursache haben in

1. lokalen Unterschieden der Antiproteasekonzentration an den Orten der Proteasefreisetzung,
2. unterschiedlichen Affinitäten der Protease für die verschiedenen, in unterschiedlichen Konzentrationen im Plasma vorliegenden Substraten und für die Inhibitoren,
3. sekundären Veränderungen im Gerinnungssystem nach direkter Proteolyse von Gerinnungsfaktoren, wie sie z.B. durch eine in Abhängigkeit von der ELP-Konzentration erfolgende Faktor XII- oder Faktor V-Aktivierung ausgelöst werden könnten

Das Auffinden von Granulozytenprotease-Inhibitor-Komplexen im Plasma von Patienten mit sogenannter "Verbrauchskoagulopathie" kann daher nur als vorläufiger Hinweis gewertet werden, daß zumindest in einigen Fällen von dissimulierter intravasculärer Gerinnung eine direkte Proteolyse von Gerinnungsfaktoren durch leukozytäre Enzyme stattfindet und nicht ein Verbrauch von Gerinnungsfaktoren durch Aktivierung der Gerinnung oder verstärkte Fibrinolyse.

Wegen seiner zentralen Stellung in der Wechselbeziehung zwischen Komplement-, Kinin- und Gerinnungssystem schien eine genaue Untersuchung des Einflusses der Leukozytenprotease auf den Hagemannfaktor sehr interessant. Diese Fragestellung, wie auch die Frage, ob Leukozytenproteasen direkt oder über eine Aktivierung des Hagemannfaktors Kininogene beeinflussen, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeiten nicht untersucht werden. Daß menschliche PMN, jedoch nicht Lymphozyten, aus Plasma oder aus gereinigtem α_2 -Globulin-Substrat pharmakologisch aktives Kinin abspalten können, ist beschrieben worden (133). Diese Aktivität menschlicher Granulozyten hatte ihr Maximum bei pH 7,2 bis 7,6 und war wie Kallikreine durch Trasylol hemmbar. Die subzelluläre Lokalisation der verantwortlichen Protease war nicht ermittelt worden, obwohl Hinweise bestanden, daß es sich nicht um ein lysosomales Enzym handelt. Kiningenerierung erforderte intakte Zellen mit intakter Glykolyse sowie Protein- wie RNA-Synthese. Eine neutrale kininabbauende Protease wurde ebenfalls in menschlichen PMN gefunden, und konnte auch in aufgebrochenen Zellen nachgewiesen werden.

In diesem Zusammenhang ist weiterhin interessant, daß Proteasen aus menschlichen Granulozyten die Komplementfaktoren C_3 und C_5 spalten können (39, 135). Bei der dieser Reaktion verursachenden Protease könnte es sich um ELP handeln. Wie vorläufige Versuche* zeigen, kann ELP nicht jedoch $CLP\ C_3$ abbauen. Die C_3 -Bruchstücke sind für andere PMN chemotaktisch aktiv, während C_{5a} die Freisetzung lysosomaler Enzyme aus

* In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. U. Hadding, Institut für medizinische Mikrobiologie, Mainz.

Cytochalasin B-behandelten menschlichen PMN bewirkt (135). Es ist weiterhin bekannt, daß Fibrinogenspaltprodukte neben ihrer kontrahierenden Wirkung für die glatte Muskulatur und der Erhöhung der Kapillarpermeabilität auch eine chemotaktische Aktivität auf Granulozyten ausüben (136). Da nach Inkubation von Fibrinogen mit ELP eine große Zahl von hoch- und niedermolekularen Spaltprodukten auftritt, ist auch auf diesem Wege eine Beeinflussung der Chemotaxis durch das freigesetzte Enzym denkbar. Die Chemotaxis von PMN, die eine integrale Komponente aller Entzündungsreaktionen ist, scheint somit von den Granulozyten selbst durch positiven feed-back gefördert zu werden.

4. 4. 3 Wirkung auf Lymphozyten

a) Membranveränderungen

Neben der Aufrechterhaltung eines konstanten Milieus in der Zelle wirkt die Zellmembran bei normalen und transformierten Zellen in der gleichen Weise als Vermittler und Überträger von Signalen von anderen Zellen oder von Signalen aus dem humoralen Milieu der Zelle (Serumproteine, Hormone, Prostaglandine, Kulturmedium etc.). Diese Signale wirken auf spezifische Oberflächenrezeptoren oder unspezifisch auf allgemein vorkommenden Membrankomponenten. Die Weitergabe des Signals in das Zellinnere erfolgt über membrangebundene Enzymsysteme (z.B. Adenylcyclase) (137), über aktive Transportsysteme (138) oder möglicherweise durch eine veränderte Anordnung der Membranproteine mit Weiterleitung der Information über bestimmte Zellstrukturen wie den Apparat der Mikrotubuli (139, 44).

Die Zellmembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, in die mengenmäßig den Hauptanteil der Membran-Komponenten ausmachenden Proteine und Glykoproteine eingebettet sind (140). Diese integralen Membranproteine sind entweder teilweise in die Lipid-Doppelschicht eingelagert oder durchdringen sie ganz, sodaß sie an der Innen- und Außenseite der Membranfläche nachweisbar sind. Die peripheren Membranproteine sind

dagegen nur locker an der Außenseite der Membran assoziiert (141). Die spezifischen Membranrezeptoren sind wahrscheinlich als integrale Membranproteine anzusehen.

Die äußere Membranoberfläche weist eine Reihe zusätzlicher Strukturen auf, wie verlängerte Glykoproteine, Glykolipide und Nucleinsäure, die zum Teil sehr weit in das umgebende Medium hinausragen. Die Kohlehydratanteile sind in unterschiedlicher Weise mit Neuraminsäure gekoppelt. Zusammen mit den Phosphat- und Carboxyl-Gruppen bewirken diese die negative Ladung der Zelloberfläche (Zetapotential) (142). Diese als Glykokalix bezeichneten Oberflächenstrukturen treten mit benachbarten Zellen in Wechselwirkung und sind wahrscheinlich für die primäre Bindung von Pflanzenlektinen oder Bakterientoxinen verantwortlich (43, 44, 141).

Die immunokompetenten Zellen zeigen eine Reihe von Rezeptoren, die auch bei Zellen anderer Organsysteme vorkommen (Histokompatibilitätsantigene, Blutgruppen-Glykoproteine, Lektin- und Mitogenrezeptoren). Daneben finden sich für Lymphozyten spezifische Rezeptoren (Übersicht: 143). Alle diese Rezeptoren sind wahrscheinlich integrale Proteine der Zellmembran. Aufgrund ihrer Funktion sind zwei Gruppen von Lymphozyten, die thymusabhängigen T-Lymphozyten sowie die im Knochenmark gebildeten B-Lymphozyten zu unterscheiden. Diese Unterteilung kann auch aufgrund ihrer Oberflächenmerkmale getroffen werden. Menschliche T-Zellen besitzen die Fähigkeit, Schaferythrozyten an ihre Oberfläche zu binden. Die Natur dieses Rezeptors ist bisher nicht aufgeklärt. Auf der anderen Seite haben B-Zellen eine hohe Konzentration an Oberflächenimmunglobulin. Sie besitzen weiterhin einen Rezeptor für die aktivierte dritte Komplementkomponente (C_3) und binden Immunglobuline über den Fc Anteil, wenn sie mit Antigen komplexiert oder durch Hitze aggregiert sind (Immunkomplex- oder Fc-Rezeptor). Sowohl die T- wie auch die B-Zellrezeptoren sind in unterschiedlichen Phasen der Zellentwicklung und in Abhängigkeit vom Zellcyclus unterschiedlich an der Membran nachweisbar.

Die bisher in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse über den Einfluß proteolytischer Enzyme auf Lymphozytenrezeptoren stimmen z.T. nicht mit den hier mitgeteilten Ergebnissen überein, weil im allgemeinen sehr hohe Proteasekonzentrationen verwendet wurden. So hemmt die Trypsinbehandlung von menschlichen peripheren Blutlymphozyten deren Fähigkeit Schafsferythrozyten zu binden, wenngleich die Bindungsfähigkeit nach Inkubation bei 37° C wiedergewonnen wird. Bei diesen Untersuchungen wurden Trypsinmengen im Milligramm-Bereich verwendet (144 - 146). Die eigenen Befunde unter Verwendung von Mikrogrammengen von ELP und CLP (vergl. 3.6.3.1) wie auch von Trypsin und Chymotrypsin (unveröffentlichte Ergebnisse) zeigen dagegen bei peripheren Blutlymphozyten eine deutliche Zunahme der Rosettenbildung wie auch eine Zunahme der Stabilität der Rosetten selbst. Eine Zunahme der Rosettenbildung wurde auch nach Papainbehandlung beobachtet (147). Ob diese Befunde Ausdruck einer Freilegung neuer Rezeptoren für die Schafsferythrozyten oder einer Verringerung der elektrostatischen Oberflächenladung und dadurch bedingter besserer Annäherung beider Zelltypen ist, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Da Neuraminidasebehandlung sowohl von Schafsferythrozyten wie auch von Lymphozyten zu einer vermehrten Rosettenbildung führt (148), ist es wahrscheinlicher, daß die Verringerung der Oberflächenladung eine größere Rolle spielt.

Der Befund, daß es unter Versuchsbedingungen, bei denen nahezu alle T-Lymphozyten mit Schafsferythrozyten Rosetten bilden, zu einer weiteren Zunahme der Zahl rosettenbildender Zellen kommt, war überraschend. Er läßt sich so interpretieren, daß durch die Proteasebehandlung eine Subpopulation der B-Zellen ebenfalls die Fähigkeit der Rosettenbildung erlangt. Durch Doppelmarkierungsversuche ließ sich direkt zeigen, daß ein Teil der nach Proteasebehandlung rosettenbildenden Zellen auch Immunglobuline an der Zelloberfläche besitzt und somit B-Lymphozyten darstellt (verg. Tab. 15). Vor kurzem wurde auch nach Neuraminidasebehandlung das Auf-

treten doppeltmarkierter Lymphozyten, d.h. von Lymphozyten mit B- und T-Zell-Merkmalen beobachtet (149).

Die Oberflächenimmunglobuline der B-Lymphozyten werden durch eine Behandlung mit Trypsin (150) wie auch mit ELP und CLP (vergl. Abb. 37) in einem niedrigen Konzentrationsbereich abgebaut. Dagegen zeigen auch hohe Protease-Konzentrationen keine Beeinflussung des Fc-Rezeptors (151, 152), ein Befund der auch vorläufigen eigenen Ergebnissen entspricht. Da ein Teil der B-Lymphozyten auch nach langdauernder Proteolyse die Oberflächenimmunglobulinen nicht verliert, ist es möglich, daß diese Subpopulation identisch ist mit derjenigen, die nach Proteasebehandlung auch Schafserythrozyten anlagern kann. Die Ergebnisse der Literatur zeigen bei B-Zellen eine Abnahme der C_3 -Rezeptoren bei hohen Protease-Konzentrationen (151, 153). Im Gegensatz dazu konnten wir eine vermehrte Bindung von C_3 nach Proteolyse mit niedrigen Konzentrationen der beiden Granulozyten-Enzyme nachweisen (siehe Abb. 39). Diese Zunahme der Zellen mit C_3 -Rezeptoren war bei ELP stärker ausgeprägt als bei CLP. Bei höheren CLP-Konzentrationen kam es ebenfalls zu einem Abbau des Komplementrezeptors.

Die Ergebnisse über den Effekt von Granulozyten-Proteasen auf Lymphozyten-Membranrezeptoren sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt schwer zu interpretieren, besonders weil die biochemische Charakterisierung der meisten Rezeptoren noch fehlt. Sie zeigen jedoch, daß eine deutlich unterschiedliche Sensibilität der genannten Rezeptoren gegenüber proteolytischer Behandlung vorliegt. So spricht die Abnahme der Oberflächenimmunglobulin-Rezeptoren an B-Lymphozyten nach proteolytischer Verdauung für einen direkten Abbau. Dagegen könnte die vermehrte Bindung von Schafserythrozyten an T-Lymphozyten und die vermehrte Anlagerung von C_3 an B-Lymphozyten Ausdruck einer unspezifischen Beeinflussung der Glykokalix (Abspaltung von hindernden Proteinen oder Verminderung von Oberflächenladungen) sein. Auch ein Angriff auf einige wenige Membranproteine, der Veränderungen der Membranstruktur zur

Folge hat, wie es für niedrige Trypsinkonzentrationen bei Erythrozytenmembranen beschrieben wurde (154), muß diskutiert werden. Unabhängig davon zeigen diese Untersuchungen jedoch, daß die im Rahmen der Entzündungsreaktion freigesetzten Granulozyten-Proteasen durch den engen Kontakt von Granulozyten und Lymphozyten die Membraneigenschaften von Lymphozyten und damit wahrscheinlich die Funktion dieser Zellen erheblich beeinflussen können.

b) Stimulierung der DNS-Synthese

Veränderungen der Zelloberfläche, die zu einer vermehrten Agglutinierbarkeit durch Pflanzenlektine führen, sind im allgemeinen mit einem Verlust der Wachstumskontrolle verknüpft. Die virusinduzierte Zelltransformation führt ausser dem Erwerb der Tumoreigenschaften auch zu einer vermehrten Agglutinierbarkeit (44). In gleicher Weise wie eine onkogene Transformation beeinflusst auch eine Behandlung von Fibroblasten mit Trypsin deren Agglutinierbarkeit durch Pflanzenlektine und hebt die dichteabhängige Wachstumskontrolle auf (155, 156). Das veränderte Zellwachstum dauert so lange an wie die Protease im Medium zugegen ist. Auch die Behandlung von Lymphozyten mit Trypsin und Chymotrypsin führt zu einer Blastzellbildung der sich normalerweise in der G_1 -Phase befindenden Zellen (157) und zu einer Stimulierung des 3H -Thymidineinbaues in die DNS (158). Im Gegensatz zu diesen Befunden, die eine direkte Stimulierung des Zellwachstums durch Proteasebehandlung erkennen lassen, zeigen die vorliegenden Ergebnisse, daß die Leukozytenproteasen die DNS-Synthese der Lymphozyten nicht direkt stimulieren, jedoch die Stimulierbarkeit durch Pflanzenlektine erhöhen. Die Wirkung der Proteasen auf die Lymphozyten ist dabei von der Konzentration und der Einwirkungsdauer der Protease ebenso abhängig wie von der Dosis des stimulierenden Mitogens. Sowohl die Stimulierung von T- als auch von B-Lymphozyten wurde beeinflusst. Die Proteasebehandlung mit ELP in niedrigen Konzentrationen zeigte im allgemeinen bei kurzzeitiger Inkubation (0 - 15 min.) eine ausgeprägte

Verstärkung der mitogenabhängigen Lymphozytenstimulierung, während die kurzzeitige Behandlung mit CLP nur einen geringen Effekt hervorrief oder sogar hemmend wirkte. Eine längere Behandlung führte auch bei CLP zu einer Stimulierung der DNS-Synthese. Ob die beiden Leukozytenproteasen in Langzeitkulturen ohne Serum auch eine direkte Lymphozytenstimulierung herbeiführen können, wie sie für B-Lymphozyten durch Trypsin beschrieben ist (158), müssen weitere Versuche zeigen.

In der Literatur liegen nur wenige sich widersprechende Befunde über den Einfluß von proteolytischen Enzymen auf die mitogenabhängige Lymphozytenstimulierung vor (159 -161). So wurde eine Hemmung des ^3H -Thymidineinbaues in menschliche Lymphozyten nach Behandlung mit 0,1 % Trypsin beobachtet (159), während dieselbe Trypsinkonzentration bei Rattenmilzzellen zu einer Stimulierung des PHA-Responses führte (160). Eine Verstärkung des stimulierenden Effektes von PHA wurde auch bei Kaninchenlymphozyten nach Behandlung mit 0,005 % Trypsin gefunden (161).

Die von den früheren Autoren diskutierten Gründe für den verstärkten Thymidineinbau sind:

- a) Freilegung eines höheren Anteils von Oberflächenrezeptoren für das Mitogen,
- b) Lymphozyten, die vorher nicht stimulierbar waren, sind aufgrund proteolytischer Entfernung sterisch hindernder Proteine der Stimulierung zugänglich.

Die Ergebnisse mit ^{125}J -markiertem PHA zeigen zum Teil eine vermehrte Bindung des Mitogens in dem verwendeten Dosisbereich, in dem PHA seine mitogene Wirkung ausübt. In diesem Bereich werden jedoch nur 3 - 10 % der vorhandenen Rezeptoren besetzt (164). Über eine Zahl der Bindungsstellen, die erst mit hohen Mitogenkonzentrationen meßbar wäre, kann daher nichts ausgesagt werden. Die Angaben der Literatur zeigen aber, daß die kurzzeitige Trypsinbehandlung von Lymphozyten nicht zu einer Zunahme der Bindungsstellen für das Mitogen führt (162), ähnlich wie die vermehrte Agglu-

tinierbarkeit von Fibroblasten nach Trypsinbehandlung nicht von einer Zunahme der Lektinbindungsstellen begleitet ist (163).

Da im mitogenen Dosisbereich nur ein Teil der Rezeptoren besetzt ist, scheint nicht die Gesamtzahl, sondern die Assoziationskonstante der Rezeptoren für das Mitogen entscheidend zu sein. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die kurzzeitige Inkubation der Lymphozyten mit niedrigen Proteasekonzentrationen zu einer Erhöhung der Bindungskonstante, die kurze Inkubation mit höheren Proteasekonzentrationen, vor allem aber die lange Inkubation zu einer Erniedrigung führt.

Die zweite Hypothese wird gestützt durch die autoradiographischen Befunde einer höheren Zahl von Lymphoblasten nach Proteasebehandlung (161). Dieser Befund läßt sich jedoch auch durch eine vermehrte ^3H -Thymidineinbaurrate erklären und würde dann bedeuten, daß nicht mehr Zellen transformieren, sondern daß der Prozeß der Lymphozytenstimulierung durch Mitogene schneller abläuft.

Die vorstehenden Überlegungen führen jedoch nicht zu einem Hinweis, über welchen molekularen Mechanismus proteolytische Enzyme die Lymphozytenstimulierung durch Mitogene verstärken können. Nach den derzeitigen Vorstellungen soll es nach Bindung des Mitogens an den Rezeptor zu dessen Neuverteilung in der Membran kommen (Clusterbildung, "Patching") (165, 166), ohne daß dadurch alleine schon die Zellstimulierung ausgelöst würde (167). Als Folge dieser strukturellen Membranveränderungen werden Transportkomponenten und / oder Membranenzyme in ihrer Aktivität beeinflusst, die die zur Stimulierung der Zelle führende Kaskade von Vorgängen einleiten. Ob die Bindung des Mitogens an den Rezeptor eine Strukturveränderung des Rezeptors hervorruft, die es ihm ermöglicht mit den Membranenzymssystemen in Wechselwirkung zu treten (165), ob es aufgrund eines negativ kooperativen Effekts zu strukturellen Membranveränderungen kommt (168) oder, ob diese erst durch die

Clusterbildung von mitogenbeladenen Rezeptoren verursacht werden, ist noch weitgehend spekulativ.

Da die Vorstellungen über die Zusammenhänge der Rezeptorbindung, der Strukturveränderungen der Membran und die daraus folgende Beeinflussung von Membranaktivitäten noch sehr hypothetisch sind, ist eine genauere Diskussion der molekularen Veränderungen durch proteolytische Enzyme zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Es läßt sich jedoch sagen, daß Proteasen sowohl durch direkten Einfluß, wie durch Veränderung der Umgebung, der Oberflächenladung oder allgemein der Fluidität der Zellmembran die Aktivität von Transportsystemen oder Enzymen und damit die Stimulierung der Zelle beeinflussen könnten. In niedrigen Konzentrationen könnten proteolytische Enzyme verschiedener Spezifität durch unspezifischen Abbau der Glycokalix und durch Verringerung der Oberflächenladung die Diffusion der Rezeptoren erleichtern, wodurch es zu einer rascheren Clusterbildung oder Assoziation des nach Binden des Mitogens allosterisch geänderten Rezeptors mit dem aktivierbaren Membranenzymssystem käme. Dies würde die beobachtete Erhöhung der Mitogen-Dosiskurve erklären. Es ist bekannt, daß suboptimale Konzentrationen verschiedener Lektine synergistisch wirken in der Auslösung der Lymphozytenstimulierung (vergl. auch 3.6.1.2). In ähnlicher Weise könnte die durch Proteasebehandlung einerseits und Mitogen andererseits hervorgerufene Strukturänderung der Membran sich gegenseitig verstärken und so die beobachtete Verschiebung der Mitogendosiskurve zu niedrigeren Mitogendosen verursachen. In Abhängigkeit von der Spezifität der Protease könnte bei länger dauernder Inkubation oder bei höheren Enzymkonzentrationen, die durch die Proteasebehandlung verursachte Membranveränderung alleine ausreichen, um die Stimulierung der Lymphozyten auszulösen. Die beobachtete Hemmung der Lymphozytenstimulierung bei hohen Proteasekonzentrationen könnte in direkten Veränderungen an den Mitogenrezeptoren oder an den Transport- und Enzymsystemen der Zellmembran ihre Ursache haben.

Andererseits ist es auch möglich, daß die Proteasen in niedrigen Konzentrationen sehr spezifisch nur ein oder einige Membranproteine abbauen, die möglicherweise eine regulatorische Funktion haben. Ein solcher spezifischer Abbau zweier Proteine, der zu morphologischen Veränderungen an den Vesikeln führte, wurde nach Behandlung mit niedrigen Trypsinkonzentrationen an Erythrozytenmembranen beobachtet (154). Unter den angewandten Bedingungen erfolgte keine Freisetzung von Membrankomponenten ins Medium. Bei der Behandlung von Fibroblasten mit Trypsinkonzentrationen, die zur Aufhebung der dichteabhängigen Wachstumskontrolle führen (155), kommt es ganz analog zur Abdauung nur eines Membranproteins (172, 173). Dieses Protein ist auch in virustransformierten Zellen nicht nachweisbar (172, 174). Auch das Auffinden von proteolytischer Aktivität in einer Reihe von Wachstumsfaktoren aus Maus-Submaxillardrüsen (Literaturhinweise in 175) sowie die wachstumsfördernden Eigenschaften der enzymatisch aktiven Untereinheit des Nervenwachstums-stimulierenden Faktors (175), deuten auf eine regulatorische Funktion proteolytischer Enzyme für das Zellwachstum, die durch ihre Spezifität bestimmt wäre.

Ob neben den beschriebenen möglichen Einwirkungen von proteolytischen Enzymen noch andere Einflüsse eine Rolle bei der Lymphozytenaktivierung spielen, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Vorläufige Befunde mit den Leukozytenproteasen deuten darauf hin, daß neben der direkten Wirkung auf die Zellmembran auch eine indirekte, wahrscheinlich durch Spaltprodukte von Serumproteinen bedingte Wirkung auf die Lymphozytenstimulierung möglich ist. So kommt es auch nach Vorinkubation der Proteasen mit Serum zu einer Erhöhung des ³H-Thymidineinbaues. Eine Beteiligung von Serum wurde auch für die Wirkung der aus transformierten Zellen freigesetzten Proteasen gezeigt (169, 44). Die zur Stimulierung der DNS-Synthese ruhender Zellen durch diese Enzyme erforderliche Serumkomponente wurde als Plasminogen erkannt (170).

Die wachstumsfördernde Wirkung von PMN-Proteasen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur an Lymphozyten untersucht. Ob sie auch die dichteabhängige Wachstumskontrolle von Fibroblasten aufheben oder das Wachstum anderer Zellen beeinflussen können, ist noch unbekannt. Von besonderem Interesse ist hierzu der Befund von MOSSER et al. (176), daß eine erhöhte, durch Connavalin A induzierte Agglutinierbarkeit von Mäusefibroblasten, wie sie dem Verlust der normalen Wachstumskontrolle parallel geht (43,44), auch durch Behandlung mit lysosomalen Extrakten aus Granulozyten erzielt werden konnte. Von den aktiven Fraktionen dieser Extrakte war die niedermolekulare mit einem Alanin-Chloromethylketon hemmbar, was nahelegt, daß die aktive Komponente dieser Fraktion mit ELP identisch sein könnte. Da Tumorzellen Plasminogenaktivator freisetzen (171), wäre auch zu klären, ob die in hoher Konzentration in Granulozyten nachweisbare Plasminogenaktivatoraktivität (32) den hier isolierten neutralen Proteasen zuzuordnen ist.

4.5 Bedeutung der Granulozyten in vivo

Die wachstumsfördernde Wirkung von Trypsin, Chymotrypsin oder Papain ist von großem theoretischem Interesse, scheint aber in vivo keine praktische Bedeutung zu haben. Sollten, wie z.B. bei einer Pankreatitis, größere Mengen von Verdauungsenzymen in die Blutbahn gelangen, so werden sie sehr rasch von den Seruminhibitoren abgefangen. Granulozytäre Enzyme könnten dagegen eine weit wichtigere Rolle spielen. PMN sind ubiquitär im ganzen Organismus verteilt und können durch Chemotaxis an jeden Ort des Immungeschehens gelangen und dort ihre Enzyme abgeben. Die Funktion der PMN war bisher vorwiegend im Hinblick auf Endocytose und Verdauung von Mikroorganismen untersucht worden (1,2). Für diese Funktion scheinen sie durch die hohe Konzentration an hydrolytischen Enzymen in den Lysosomen hervorragend ausgestattet zu sein. Mittlerweile liegen jedoch vermehrte Befunde über Exocytose

von lysosomalen Enzymen in das umgebende Milieu vor. Diese Befunde wurden bisher vorwiegend unter dem Gesichtspunkt des möglichen Abbaus von Basalmembranen, von Knorpel- oder Bindegewebe gesehen (19). Diese Wirkungen sind sicher von großer patho-physiologischer Bedeutung, wahrscheinlich sind sie aber um die Einflüsse auf das Komplement- und das Gerinnungssystem zu erweitern. Andererseits zeigen die vorgelegten Versuche, daß die durch Exocytose freigesetzten Proteasen nicht nur am Prozeß der Zerstörung des Gewebes beteiligt sind, sondern daß sie möglicherweise auch eine physiologische Funktion haben, dadurch, daß sie durch Einwirkung auf die Lymphozyten die Abwehr gegen Fremdstoffe verstärken.

5 ZUSAMMENFASSUNG

1. Neutrale Proteaseaktivität der Leukozyten ist fast ausschließlich in neutrophilen Granulozyten enthalten. Sie ist in den primären Granula der Lysosomen lokalisiert, in denen sie in aktiver Form an die Membran sehr fest assoziiert ist.

2. Die neutrale Proteaseaktivität wurde mit hochmolarer Kochsalzlösung aus den Lysosomen extrahiert und durch Chromatographie am Sephadex G 100, CM-Sephadex C 50 und Sephadex G 75 in zwei unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt: Eine elastaseähnliche Protease (ELP) mit einem Molekulargewicht von 27 - 31 000 Dalton und einem isoelektrischen Punkt von $10,1 \pm 0,1$ sowie eine chymotrypsinähnliche Protease (CLP) mit einem Molekulargewicht von 18 - 22 000 Dalton und einem isoelektrischen Punkt oberhalb von $\text{pH } 11,4 \pm 0,1$. Beide Proteasen zeigen in der Polyacrylamidelektrophorese eine ausgeprägte Heterogenität.

3. Die beiden leukozytären Proteasen sind sehr stabile Enzyme. Ihre optimale Aktivität gegen Proteinsubstrate zeigen sie bei $\text{pH } 7,5$ (CLP) bzw. $\text{pH } 8,0$ (ELP) und der Ionenstärke $0,2 \text{ M}$ (CLP) bzw. $0,3 \text{ M NaCl}$ (ELP). Die Spaltung von denaturiertem Hämoglobin sowie von nativem Fibrinogen, Casein und Albumin durch die beiden Enzyme wurde in Abhängigkeit von der Enzym- wie der Substratkonzentration untersucht. Elastin wird nur von ELP, nicht aber von CLP hydrolysiert.

4. Die elastaseähnliche Protease zeigte Esteraseaktivität gegenüber Acetyl-L-Alanyl- α -Naphthylester und BOC-L-Alanyl-p-Nitrophenylester. Dagegen wies die chymotrypsinähnliche Protease Esteraseaktivität gegenüber Acetyl-D,L-Phenylalanyl- β -Naphthylester und gegen die an der Aminogruppe geschützten L-Phenylalanyl- und L-Tyrosin-p-Nitrophenylester auf.

5. Aus der Homobarkeit der beiden Leukozytenproteasen durch DFP wird geschlossen, daß es sich um Serinproteasen handelt. Weiterhin wird ELP durch Acetylalanylalanylalanylchloromethylketon gehemmt, während CLP durch Tosylphenylalanylchloromethylketon nur verlangsamt inaktiviert wird. Durch SH-Reagentien

und Komplex-Bildner wird die Aktivität der beiden Enzyme nicht beeinflusst. Durch die Seruminhibitoren α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin werden beide Enzyme, durch α_1 -Antichymotrypsin wird nur CLP gehemmt. Inhibitoren aus Leguminosen und aus Pankreas erwiesen sich als schwache Hemmstoffe.

6. Durch Immunisierungen von Kaninchen mit den gereinigten Enzymen wurden spezifische Antiseren gewonnen und zur immunologischen Charakterisierung der Proteasen verwandt.

7. Die in vitro-Behandlung mit der elastaseähnlichen Leukozytenprotease führte zu einer raschen Inaktivierung der gereinigten Gerinnungsfaktoren I, II, VIII, XII und XIII und zu einer langsameren Beeinflussung der Faktoren V und VII. Dagegen führte die Behandlung mit der chymotrypsinähnlichen Protease zu einem raschen Aktivitätsverlust der Faktoren VII, VIII und XII, während die Faktoren I, II und V nur langsam angegriffen wurden. Die Inkubation von Faktor V mit den beiden Proteasen führt zu einer vorübergehenden Aktivierung. Die Gerinnungsfaktoren II, V, VIII und XII werden durch ELP auch im Plasma angegriffen.

8. Die proteolytische Behandlung menschlicher peripherer Lymphozyten mit den beiden Leukozytenenzymen bewirkt:

- a) Eine Zunahme der Zahl der Zellen, die neuraminidasebehandelte Schaferythrozyten in Form einer Rosette anlagern, sowie eine Stabilisierung dieser Rosetten. Ein Teil der rosettenbildenden Zellen zeigt Oberflächeneigenschaften von T- wie von B-Lymphozyten.
- b) Einen Abbau der Oberflächenimmunglobuline von B-Zellen.
- c) Eine Zunahme der Zahl von Lymphozyten, die an der Zellmembran Rezeptoren für die aktivierte dritte Komplement-Komponente aufweisen.
- d) Keine vermehrte Bindung von Phythämagglutinin aus *Phaseolus vulgaris* an die Zellen.

9. Die Einwirkung der beiden Proteasen auf menschliche periphere Lymphozyten führt zu einer erhöhten Stimulierbarkeit

dieser Zellen durch das T-Zell-Mitogen Phythämagglutinin. Das Ausmaß dieses Adjuvanseffektes ist von der Zeitdauer der Proteasebehandlung der Zellen wie von der Konzentration des Mitogens abhängig. Die größten Effekte wurden bei kurzzeitiger Proteolyse der Lymphozyten mit Mikrogrammengen von Enzym und nachfolgender Inkubation der Zellen bei suboptimalen Mitogenkonzentrationen erzielt. Höhere Enzymkonzentrationen, längere Inkubationszeiten oder höhere Mitogenkonzentrationen führten besonders bei der chymotrypsinähnlichen Protease zu einer Hemmung der Stimulierbarkeit der Lymphozyten.

10. Die Stimulierbarkeit von B-Lymphozyten aus Lymphknoten-zellen der Maus durch Lipopolysaccharid und Cystein wird durch die elastaseähnliche Protease enorm gesteigert, während die chymotrypsinähnliche Protease einen geringeren Effekt zeigt; bei gleichzeitiger Stimulierung der Zellen mit Lipopolysaccharid und Cystein wirkt sie sogar hemmend.

11. Der Einfluß der leukozytären Proteasen auf die DNS-Syntheserate von Lymphozyten wurde auf der Grundlage des "Fluid-Membran-Modells" als Auswirkung eines unspezifischen Angriffs auf integrale Membranproteine interpretiert, durch den die Beweglichkeit der Mitogenrezeptoren und deren Interaktion mit den Membranenzym- oder Transportsystemen beeinflusst wird, die für die Auslösung der Zellstimulierung eine zentrale Rolle spielen.

12. Neben der Phagozytose mikrobieller Antigene können polymorphkernige Leukozyten durch Exocytose lysosomale Enzyme in das umgebende Milieu abgeben. Durch die Wirkung der freigesetzten elastaseähnlichen Protease könnten sie somit einerseits zur Gewebszerstörung und durch Einwirkung auf das Komplement- und Kininsystem zu einer Verstärkung von Entzündungsreaktionen führen, andererseits aber durch Einwirkung auf die Lymphozyten die körpereigene Abwehr auch verstärken.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) SIMSON, J.V. und SPICER, S.S. (1973), in *Internat. Rev. Exp. Pathol.* Vol. 12, Edt. G.W. Richter und M.A.Epstein
Academie Press, New York, S. 79 - 118.
- (2) CLINE, M.J., CRADDOCK, C.G., GALE, R.P., GOLDE, D.W. und LEHRER, R.I. (1974), *Ann. Int. Med.* 81, 801-816.
- (3) CARTWRIGHT, G. E., ATHENS, J.W. und WINTROBE, M.M. (1964), *Blood* 24, 780 - 803.
- (4) BAINTON, D.F. und FARQUHAR, M.G. (1968), *J. Cell. Biol.* 39, 299 - 317.
- (5) WARD, P.A. (1971), *Am. J. Pathol.* 64, 521 - 530.
- (6) KAPLAN, P.A., KAY, A.B. und AUSTEN, K.F. (1972), *J. exp. Med.* 135, 81 - 97.
- (7) KAPLAN, P.A., GOETZL, E.J. und AUSTEN, K.F. (1973), *J. Clin. Invest.* 52, 2591 - 2595.
- (8) GOETZL, E.J., GIGLI, I., WASSERMAN, S. et al. (1973), *J. Immunol.* 111, 938 - 945.
- (9) WARD, P.A. (1972), in *Inflammation: Mechanisms and Control*. Edt. LEPOW et al., Academic Press, New York, S. 301
- (10) WINKELSTEIN, J.A. (1973), *J. Pechiatr.* 82, 747-753.
- (11) BAINTON, D. F. (1973), *J. Cell. Biol.* 58, 249 - 264.
- (12) KARNOVSKY, M.L. (1962), *Physiol. Rev.* 42, 143 - 168.
- (13) ZEYA, H.I. und SPITZNAGEL, J.K. (1966), *Scienc* 154, 1049 - 1051.
- (14) ZEYA, H.I. und SPITZNAGEL, J.K. (1968), *J. exp. Med.* 127, 927 - 941.
- (15) OLSSON, I. und VENGE, P. (1972), *Scand. J. Haematol.* 9, 204 - 214.
- (16) JENSEN, M.S. und BAINTON, D.F. (1973), *J. Cell. Biol.* 56, 379 - 388.
- (17) HENSON, P. (1971), *J. Immunol.* 107, 1535 - 1557.
- (18) WEISMANN, G., ZURIER, R.B., SPIELER, P.J. und GOLDSTEIN, I.M. (1971), *J. exp. Med.* 134, 149s -165s.
- (19) JANOFF, A. (1972), *Am. J. Pathol.* 68, 579 -
COCHRANE, C.G. (1968), *Adv. Immunol.* 9, 97 - 162.
- (20) HAVEMANN, K., SCHMIDT, M. und RUBIN, A.D. (1973),
in: *Humoral Control of Growth and Differentiation*,
Edt: LOBUE, J. und GORDON, A.S., Academic Press,
New York, S. 184 - 213.

- (21) BACH, F.H., ALTER, B.J., SOLLIDAY, S., ZOSCHKE, D.C. und JANIS, M. (1970), Cell. Immunol. 1, 219 - 227.
- (22) DUTTON, R.W., Mc CARTHY, M.M., MISHELL, R.J. und RAIDT, D.J. (1970), Cell. Immunol. 1, 196
- (23) LEVIS, W.R. und ROBBINS, J.H. (1970), Exp. Cell. Res. 61, 153 - 158.
- (24) HAVEMANN, K. und SCHMIDT, W. (1974) in: Proc. 8th Leuc. Cult. Conf.: Lymphocyte Recognition, Edt. K. Lindahl-Kiessling, S. 181 - 185, Academic Press, New York.
- (25) RULOT, H. (1904), Arch. Int. Physiol. 1, 152
- (26) OPIE, E.L. (1922), Physiol. Rev. 2, 552
- (27) WILLSTÄTTER, R., BAMANN, E. und ROHDEWALD, M. (1929), Z. Physiol. Chem. 185, 267 - 280.
- (28) MOUNTER, L.A. und ATIYEH, W. (1960), Blood 15, 52 - 59.
- (29) BARNHART, M.I., QUINTANA, C., LENON, H.L., BLUM, G.B. und RIDDLE, J.M. (1968), Ann.N.Y.Acad. S. 146, 527 - 539.
- (30) ASTRUP, T., HENRICHSSEN, J. und KWAAN, H.C. (1967), Blood 29, 134 - 138.
- (31) STILES, M.A. und FRAENKEL-CONRAT, J. (1968), Blood 32, 119 - 133.
- (32) PROKOPOWICZ, J. (1968), Thromb. Diath. Haemorrh. 19, 84 - 93.
- (33) OHLSSON, K. (1971), Clin.Chim.Acta 32, 399 - 405.
- (34) OHLSSON, K. (1971), Scand.J.Clin.Lab.Invest. 28, 251 - 253.
- (35) JANOFF, A. und SCHERER, J. (1968), J.exp.Med. 128, 1137 - 1145.
- (36) FOLDS, J.D., WELSH, J.R.M. und SPITZNAGEL, J.K. (1972), Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 139, 461 - 463.
- (37) LAZARUS, G.S., DANIELS, J.R., BROWN, R.S., BLADEN, H.A. und FULLMER, H.M. (1968), J.Clin.Invest. 47, 2622 - 2629.
- (38) IHNARRO, L.J., ORANSKY, A.L. und PERPER, R.J. (1973), Clin. Immunol. Immunopathol. 2, 36
- (39) TAUBMAN, S.B., GOLDSCHMIDT, P.R. und LEPOW, I.H. (1970), Fed.Proc. 29, 434a.
- (40) MOVAT, H.Z., STEINBERG, S.G., HABAL, F.M. und RANADIVE, N.S. (1973), Lab.Invest. 29, 669 - 684.
- (41) BECKER, E.L. und WARD, P.A. (1969), J.exp.Med. 129, 569 - 584.
- (42) WARD, P.A. und BECKER, E.L. (1970), J.Immunol. 105, 1057 - 1068.

- (43) EMMELOT, P. (1973), *Europ.J.Cancer.* 9, 319 - 333.
- (44) POLLACK, R.E. und HOUGH, P.V.C. (1974), *Ann.Rev.Med.* 25, 431 - 446.
- (45) JANOFF, A. (1972), *Ann.Rev.Med.* 23, 177 - 190.
- (46) LOHRMANN, H.-P., NOVIKOV, L. und GRAW, R.G. (1974), *J.exp.Med.* 139, 1553 - 1567.
- (47) HOZUMI, M., OGAWA, M., SUGIMURA, T., TAKEUCHI, T. und UMEZAWA, H. (1972), *Cancer Res.* 32, 1725 - 1728.
- (48) GOLDBERG, A.R. (1974), *Ann.N.Y.Acad. Sci* 234, 348 - 354.
- (49) GOETZ, J.E., WEINSTEIN, C. und ROBERTS, E. (1972), *Cancer Res.* 32, 2469 - 2474.
- (50) SCHNEBL, H.P. und HAEMMERLI, G. (1974), *Nature* 248, 150 - 151.
- (51) TCHORZEWSKI, H. und DENYS, A. (1972), *Experientia* 28, 462
- (52) SAITO, M. YOSHIZAWA, T. AOYAGI, T. und NAGAI, Y. (1973), *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 52, 509 - 575.
- (53) BIRNBAUM, S.M. (1952), *J.Biol.Chem.* 194, 455 - 470.
- (54) SCHAICH, E. (1973), *Biochem. Promotionsarbeit*, Marburg.
- (55) MORGAN, J.F. Morton, und PARKER (1950), *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 73, 1 - 8.
- (56) BOYUM, (1968), *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 21, Suppl. 97, 77 - 89.
- (57) PINCUS, S., BIANCO, C. und NUSSENZWEIG, V. (1972), *Blood* 40, 303 - 310.
- (58) LAMWICK, (1966), *Acta Haematol.* 35, 294 - 303.
- (59) NIR, E., EFRAT, P. und DANON, D. (1970), *Brit.J.Haematol.* 18, 237 - 244.
- (60) HALLMANN, L. (1966), *Klin. Chemie und Mikroskopie*, 10. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart.
- (61) MERCHANT, D.I., KAHN, R.H. und MURPHY, H., *Handbook of cell and organ culture*, Burgers Publishing Co.
- (62) MICHELMAYR, G., HUBER, C., FALKENCAMMER, M. und HUBER, M. *Schweiz.Med.Wochenschrift* 104, 815 - 820. (1974)
- (63) HOLBOROW, E.J. (Edt.) (1970), *Standardisation in Immunofluorescence*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Edinburgh.
- (64) LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J. (1951), *J.Biol.Chem.* 193, 265 - 275.
- (65) GEIGER, P.J. und BESSMAN, S.P. (1972), *Ann .Biochem.* 49, 467 - 473.
- (66) BAILEY, J.L. (1967), *Techniques in Protein Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, London.

- (67) GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.S. und DAVID, M.M.
(1949), J.Biol.Chem. 177, 751 - 766.
- (68) HAVEMANN, K. und AREND, P. (1965),
Z.Ges.exp.Med. 139, 781 - 797.
DE LUMEN, B.O. u. TAPPEL, A.L. (1970),
Anal.Biochem. 36, 22 - 29.
- (69) ANSON, M.L. (1938), J.gen.Physiol. 22, 79 - 83.
- (70) Mc KINNEY, R.M., SPILLANC, J.T. und PEARCE, G.W.
(1964), J.Immunol. 93, 232 - 242.
- (71) BANGA, J., BALO I, und HORVATH, M. (1959),
Biochem.J. 71, 544 - 551.
- (72) VISSER, L. und BLOUT, E.R. (1969),
Fed.Proc. 28, 407.
- (73) BERGMEIER, H.U. (1970), Methoden der enzymatischen
Analyse, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim.
- (74) WATTIAUX, R. und De DUVE, C. (1956),
Biochem. J. 63, 606 - 608.
- (75) DAVIS, B.J. (1964), Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 404 - 427.
- (76) NATURER, H.R. (1971), Disc Electrophoresis,
Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- (77) REISFELD, R.A., LEWIS, K. J. und WILLIAMS, D.E.
(1962) Nature 195, 281 - 383.
- (78) WEBER, K. und OSBORN, M. (1969),
J.Biochem. 244, 4406 - 4412.
- (79) DIEZEL, W. KOPPERSCHLÄGER, G. und HOFMANN, E.
(1975) Anal.Biochem. 48, 617 - 620.
- (80) MARKERT, C.L. und HUNTER, R.L. (1959),
J.Histochem.Cytochem. 7, 42 - 49.
- (81) WEIR, M.D. (Edt) (1967), Experimental Immunology,
F.A. Davis Comp., Philadelphia.
- (82) TISCHENDORF, F.W., LEDDEROSE, G., WILMANNS, W.,
TISCHENDORF, M.M., (1973), Nature 245, 379 - 380.
- (83) LAURELL, C.B. (1966), Anal.Biochem. 15, 45 - 52.
- (84) HAVEMANN, K. und BÜRGER, S. (1971), Eur.J.Immunol. 1,
285 - 290.
- (85) SCHUMANN, G., SCHNEBLI, H.P. und DUKOR, P. (1973),
Int.Arch. Allergy 45, 331 - 340.
- (86) FLAD, M.D., HOCHAPFEL, G., FLIEDNER, T.M. und
HEIMPEL, H. (1970), Acta Haematol. 44, 21 - 31.
- (87) BROWN, G. und GREAVES, M.F. (1974),
Scand.J.Immunol. 3, 161 - 172.
- (88) FAHNEY, J.L. (1967), im
C.A. WILLIAMS und CHASE, M.W. (Edt),
Methods in Immunology and Immunochemistry Bd. 1,
S. 321 - 332, Academic Press, New York.

- (89) BYRT, und ADA, (1969), Immunology 17, 503 - 516.
- (90) HUBER, Ch., KURZ, R., ASAMER, H., HUBER, H., BRAUN-STEINER, H., (1974), Klin.Woschr. 52, 127 - 133.
- (91) BIANCO, C, PATRICK, R. und NUSSENZWEIG, V. (1970), J.exp.Med. 132, 702 - 720.
- (92) SCATCHARD, G. (1949), Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660 - 672.
- (93) EGBRING, R., SCHMIDT, W. und HAVEMANN, K. (1973), Blut 27, 6 - 29.
- (94) JANOFF, A. und BLONDIN, J. (1971), Lab.Invest. 25, 565 - 571.
- (95) ROBBINS, K.C., SUMMARIA, L., ELWYN, D. und BARLOW, G.M., (1965), J.Biol.Chem. 240, 541 - 550.
- (96) KAMINSKI, M. und DUBOIS, P. (1972), Eur.J.Biochem. 29, 175 - 183.
- (97) GERY, I. und HANDSCHUHMACHER, R.E. (1974), Cell. Immunol. 11, 162 - 169.
- (98) RINDLER, R. und BRAUNSTEINER, H. (1975), Biochem.Biophys.Acta 379, 606 - 617.
- (99) CUATRECASAS, P., WILCHEK, M. und ANFINSEN, C.B. (1968), Proc.Nat.Acad.Sci. 61, 636 - 643.
- (100) LIEBERMANN, J. und KANESCHIRO, W. (1972), J.Lab.Clin.Med. 80, 88 - 101.
- (101) JANOFF, A. (1973), Lab.Invest. 29, 458 - 464.
- (102) OHLSSON, K. und OLSSON, I. (1973), Eur.J.Biochem. 42, 519 - 527.
- (103) MOLONEY, W.G., Mc PHERSON, K. und FLIEGELMAN, L. (1960), J.Histochem.Cytochem. 8, 200 - 207.
- (104) LI, C.Y., LAM, K.W. und YAM, L.T. (1973), J.Histochem.Cytochem. 21, 1 - 12.
- (105) RINDLER, R., HÖRTNAGL, H., SCHMALZL, F. und BRAUN-STEINER, H. (1973), Blut 26, 239 - 249.
- (106) SHOTTON, D.M. (1970), in Methods in Enzymology (Perlmann, G.E. und LORAND, L. Hrsg.), Bd. 19, S. 113 - 139, Academic Press, New York, London.
- (107) WILCOX, P.E. (1970), in Methods in Enzymology (PERLMANN, G.E. und LORAND, L. Hrsg.), Bd. 19, S. 64 - 108, Academic Press, New York, London.
- (108) GERBER, A.C., CARSON, J.H. und HADORN, B. (1974), Biochem.Biophys.Acta 364, 103 - 112.
- (109) KAWIAK, J., VENSEL, W.H., KOMENDER, J. und BARNARD, E.A. (1971), Biochem.Biophys.Acta 235, 172 - 187.
- (110) DAVIES, P. RITA, G.A., KRAKAUER, K. und WEISMANN, G. (1971), Biochem.J. 123, 559 - 569.

- (111) ROBBINS, K.C. und SUMMARIA, L. (1970),
in Methods in Ezymology (PERLMANN, G.E. und LORAND, L.,
Hrsg.), Bd. 19, S. 184 - 198, Academic Press. New York,
London.
- (112) HERMANN, G. und MIESCHER, P.A. (1965),
Int.Arch.Allergy 27, 346 - 354.
- (113) KLEVITCH, R.J., LETCHFORD, D. und COCHRANE, C.G.
(1974), Thrombos.Diathes.Haemorrh. 31, 30 - 39.
- (114) OHLSSON, K. und OLSSON, J. (1973), Eur.J.Biochem. 36,
473 - 481.
- (115) BECHET, J.-J., DUPAIX, A. und ROUCONS, C. (1973),
Biochemistry, 12, 2566 - 2572.
- (116) GENESTE, P. und BENDER, M.L. (1969),
Proc.Nat.Acad.Sci. 64, 683 - 685.
- (117) JANOFF, A. und BLONDIN, J. (1973),
Lab.Invest. 29, 454 - 457.
- (118) MANDELL, G.L. (1970),
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 134, 447 - 449.
- (119) ORONSKY, A., IGNARRO, L. und PERPER, R. (1973),
J.exp.Med. 138, 461 - 472.
- (120) IGNARRO, L.J. (1974), J.Immunol. 113, 298 - 308.
- (121) WÜNSCHMANN-HENDERSON, B., HORWITZ, D.L. und ASTRUP, T.
(1972), Proc.Soc.exp.Biol.Med. 141, 634 - 638.
- (122) TAICHMAN, N.S., PRUZANSKI, W. und RANADIVE, N.S.
(1972), Int.Arch.Allergy 43, 182 - 195.
- (123) WEISMANN, G., ZURIER, R.B. und HOFFSTEIN, S. (1972),
Am.J.Pathol. 68, 539 - 559.
- (124) RANADIVE, N.S., SAJNANI, A.N., ALIMURKA, K. und
MOVAT, H.Z. (1973), Int.Arch.Allergy 45, 880 - 898.
- (125) ZURIER, R.B., WEISMANN, G., HIFFSTEIN, S., KAMMERMAN, S.
und TAI, H.H. (1974), J.Clin.Invest. 53, 297 - 309.
- (126) IGNARRO, L.J., LINT, T.F. und GEORGE, W.J. (1974),
J.exp.Med. 139, 1395 - 1414.
- (127) GOLSTEIN, I., HOFFSTEIN, S., GALLIN, J. und WEISMANN, G.
(1973), Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 2916 - 2920.
- (128) MERSKEY, C. (1973), Blood 41, 599 - 603.
- (129) THOMAS, L. (1964), Proc.Soc.exp.Biol.Med. 115,
235 - 240.
- (130) COCHRAINE, C.G. und AIKIN, B.S. (1966),
J.exp.Med. 124, 733 - 752.
- (131) HALPERN, B.N. (1964), Proc.Soc.exp.Biol.Med. 115,
273 - 276.
- BURKE, J.S., URIUHARA, T., MACMORINE, D.R.L. und
MOVAT, H.Z. (1964), Life Sci. 3, 1505 - 1512.

- (132) EGBRING, R., SCHMIDT, W. und HAVEMANN, K. (1975),
eingereicht zur Veröffentlichung in Blood.
- (133) MELMON, K.L. und CLINE, M.J. (1967), Nature 213, 90-92.
- (134) BALKE, E. und SCHARMANN, W. (1974),
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 355, 958 - 969.
- (135) GOLSTEIN, I.M. und WEISMANN, G. (1974),
J.Immunol. 113, 1583 - 1588.
- (136) KWAN, H.C. und BARLOW, G.H. (1973),
Ann.Rev.Med. 24, 335 - 344.
- (137) ANDERSON, W.B., JOHNSON, G.S. und PASTAN, I. (1973),
Proc.Nat.Acad. Sci. 70, 1055 - 1059.
- (138) CUNNINGHAM, D.D. und PARDEE, A.B. (1969),
Proc.Nat.Acad.Sci. 64, 1049 - 1056.
- (139) JI, T.H. und NICOLSON, G.L. (1974),
Proc.Nat.Acad.Sci. 71, 2212 - 2216.
- (140) SINGER, S.J. und NICOLSON, G.L. (1972),
Science 175, 720 - 731.
- (141) SINGER, S.J. (1974), Ann.Rev.Biochem. 43, 805 - 833.
- (142) MEHRISHI, J.N. (1972), in:
J.A.V. BUTLER und NOBLE, D., Progress in Biophys.
and Molecular Biology, Bd. 25, S. 1 - 70,
Pergano Press, Oxford, New York.
- (143) DIXON, F.J. und KUNKEL, H.G. (1974),
Advances in Immunology, Bd. 19, Academic Press,
New York, London.
- (144) JONDAL, M., HOLM, G. und WIGZELL, H. (1972),
J.exp.Med. 136, 207 - 215.
- (145) WHITTINGHAM, S. und MACKAY, I.R. (1973),
Cell.Immunol. 6, 362 - 367.
- (146) COHNEN, G., AUGENER, W., BUKA, A. und BRITTINGER, R.G.
(1974), Acta Haematol. 51, 65 - 75.
- (147) CHAPEL, H.M. (1973),
Transplantation 15, 320 - 325.
- (148) GALILI, U. und SCHLESINGER, M. (1974),
J.Immunol. 112, 1628 - 1634.
- (149) BENTWICH, Z., DOUGLAS, S.D., SKUTELSKY, E. und
KUNKEL, H.G. (1973), J.exp.Med. 137, 1532 - 1537.
- (150) FRÖLAND, (1972), Scand.J.Immunol. 1, 269
- (151) EDEN, A., BIANCO, C. und NUSSENZWEIG, V. (1973),
Cell.Immunol. 7, 459 - 473.
- (152) DICKLER, H.B. (1974), J.exp.Med. 140, 508 - 522.
- (153) THEOFILOPOULOS, A.N., BOKISCH, V.A. und DIXON, F.J.
(1974), J.exp.Med. 139, 696 - 711.
- (154) AVRUCH, J., PRICE, I.D., MARTIN, D.B. und CARTER, J.R.
(1973), Biochem.Biophys.Acta 291, 494 - 505.

- (155) BURGER, M.M. (1970), Nature 227, 170 - 171.
- (156) SEFTON, B.M. und RUBIN, H. (1970), Nature 227, 843 - 845.
- (157) MAZZAI, D. (1966), Lancet S. 232.
- (158) VISCHER, T.L. (1974), J.Immunol. 113, 58 - 62.
- (159) LINDAHL-KIESSLING, K. und PETERSON, R.D.A. (1969), Exptl.Cell.Res. 55, 81 - 84.
- (160) UYEKI, E.M. und LLACER, U. (1968), Experientia, 24, 173 - 175.
- (161) GOODALL, D.M., PARDOE, G.I. und GREGORY, J.K. (1971), Clin.exp.Immunol. 9, 645 - 655.
- (162) NICOLSON, G.L. (1973), J.Natl.Cancer Inst. 50, 1443 - 1451.
- (163) OZANNE, B. und SAMBROCK, J. (1971), Nature (New Biol.) 232, 156 - 160.
SELA, B., LIS, H., SHARON, N. und SACHS, L. (1971), Biochem.Biophys.Acta 249, 564 - 568.
- (164) AHMANN, G.B. und SAGE, H.J. (1974), Cell.Immunol. 13, 407 - 415.
- (165) CUATRECASAS, P. (1974), Ann.Rev.Biochem. 43, 169 - 214.
- (166) UNANUE, E.R. und KARNOVSKY, M.J. (1974), J.exp.Med. 140, 1207 - 1220.
- (167) LOOR, F. (1974), Eur.J.Immunol. 4, 210 - 220.
- (168) LEVITZKI, A. (1974), J.theor.Biol. 44, 367 - 372.
- (169) UNKELESS, J.C., TOBIA, A. OSSOWSKI, L., QUIGLEY, J.P., RIFKIN, D.B. und REICH, E. (1973), J.exp.Med. 137, 85 - 111.
- (170) QUIGLEY, J.P., OSSOWSKI, L.M., REICH, E. (1974), J.Biol.Chem. 249, 4306 - 4311.
- (171) UNKELESS, J., DANO, K., KELLERMAN, G.M. und REICH, E. (1974), J.Biol.Chem. 249, 4295 - 4305.
- (172) HYNES, R.O. (1973), Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 3170 - 3174.
- (173) YAMADA, K.M. und WESTON, J.A. (1974), Proc.Nat.Acad.Sci. 71, 3492 - 3496.
- (174) VAHERI, A. und RUOSLAHTI, E. (1974), Int.J.Cancer 13, 579 - 586.
- (175) GREENE, L.A., TOMITA, J.T. und VARONS, S. (1971), Exptl.Cell.Res. 64, 387 - 395.
- (176) MOSSER, A.G., JANOFF, A. und BLONDIN, J. (1973), Cancer Research 33, 1092 - 1095.

LEBENS LAUF

29. 11. 44 geboren in Muttischen/Iglau, CSSR als 1. Kind des Landwirts Theodor Schmidt und seiner Ehefrau Johanna, geb. Groiß
- 1950 - 1955 Besuch der Volksschule in Großenbuch/ Forchheim
- 1955 - 1964 Besuch des Ohm-Gymnasiums in Erlangen
- Juli 1964 Ablegung der Reifeprüfung
- WS 1964/65 - Chemiestudium an der Universität
SS 1965 Erlangen-Nürnberg
- WS 1965/66 - Studium der Physiologischen Chemie und
SS 1969 Biochemie an der Universität Tübingen
- April 1966 Vordiplom, Teil I
- April 1967 Vordiplom, Teil II
- März - Okt. 1968 Arbeit am Biochemischen Institut der Universität Freiburg über C_1 -Stoffwechsel von anaeroben Bakterien
- Mai 1969 Diplom-Hauptprüfung
- Mai - Okt. 1969 Diplomarbeit am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof.Dr.F.Schneider über chemische Modifizierung von Carboanhydrase B vom Rind
- 1970 - 1971 Arbeit am Physiologisch-chemischen Institut Erlangen über Methylierung von t-RNS. Entwicklung eines präparativen Elektrophoresegerätes, das zum Patent angemeldet wurde
- April 1972 - Dissertation unter der Anleitung von Prof.
Okt. 1974 Dr. K.Havemann und Prof.Dr.F.Schneider an der Medizinischen Klinik und am Physiologisch-chemischen Institut der Philipps-Universität Marburg über neutrale Proteasen aus Granulozyten.

